

# HUMAN NEURONAL NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTOR COMPOSITIONS AND METHODS EMPLOYING SAME

Publication number: JP8507441T

Publication date: 1996-08-13

Inventor:

Applicant:

Classification:

- international: G01N33/50; C07K14/705; C07K14/715; C07K16/28; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/09; C12N15/12; C12P21/02; C12P21/08; C12Q1/00; C12Q1/02; C12Q1/68; G01N33/15; C12R1/91; C12N15/09; C07K14/435; C07K16/18; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/12; C12P21/02; C12P21/08; C12Q1/00; C12Q1/02; C12Q1/68; G01N33/15; G01N33/50; (IPC1-7): C12N15/09; C07K14/715; C12N5/10; C12P21/08

- european: C07K14/705K

Application number: JP19940520240T 19940308

Priority number(s): WO1994US02447 19940308; US19930028031 19930308

Also published as:

WO9420617 (A3)  
WO9420617 (A2)  
EP0688361 (A3)  
EP0688361 (A2)  
US6022704 (A1)

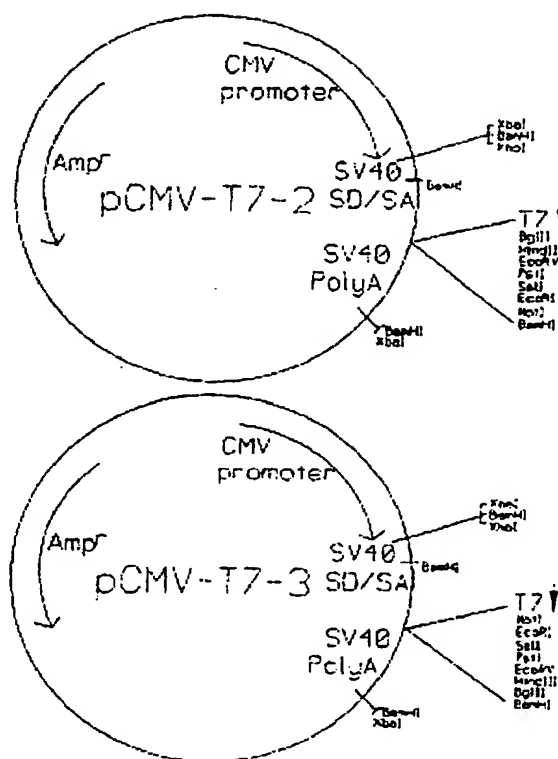
more >>

Report a data error here

Abstract not available for JP8507441T

Abstract of corresponding document: WO9420617

Nucleic acids encoding human neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha and beta subunits, mammalian and amphibian cells containing said nucleic acids, methods for producing alpha and beta subunits and recombinant (i.e., isolated or substantially pure) alpha subunits (specifically alpha 4 and alpha 7) and beta subunits (specifically beta 4) are provided. In addition, combinations of subunits (i.e., alpha 1, alpha 2, alpha 3, alpha 4, and/or alpha 7 subunits in combination with beta 4 subunits; or beta 2, beta 3 and/or beta 4 subunits in combination with alpha 4 and/or alpha 7 subunits) are provided.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

com to US 5,837,489

WO 94/20617

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平8-507441

(43) 公表日 平成8年(1996)8月13日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 N 15/09	Z N A		
C 0 7 K 14/715		8318-4H	
C 1 2 N 5/10			
		9162-4B	C 1 2 N 15/00
		9281-4B	5/00
			Z N A A
			B
		審査請求 未請求	予備審査請求 有 (全 91 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-520240  
 (86) (22) 出願日 平成6年(1994)3月8日  
 (85) 翻訳文提出日 平成7年(1995)9月7日  
 (86) 国際出願番号 PCT/US94/02447  
 (87) 国際公開番号 WO94/20617  
 (87) 国際公開日 平成6年(1994)9月15日  
 (31) 優先権主張番号 08/028, 031  
 (32) 優先日 1993年3月8日  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

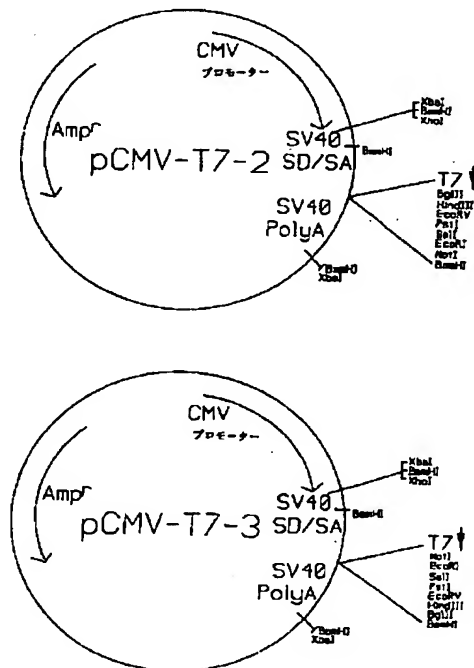
(71) 出願人 ザ ソールク インステチュート バイオ  
 テクノロジー/インダストリアル アソシ  
 エイツ, インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国92037-4641 カリフォル  
 ニア州, ラジョラ, スウィート 300, コ  
 ースト ブールバード サウス 505  
 (72) 発明者 エリオット, キャスリン, ジェイ.  
 アメリカ合衆国92117 カリフォルニア州  
 サン ディエゴ, ベイカー ストリート  
 3854  
 (74) 代理人 弁理士 浅村 皓 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体組成物およびそれらの使用方法

## (57) 【要約】

ヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体の  $\alpha$  および  $\beta$  サブユニットをコードする核酸、前記核酸を含有する哺乳類および両生類細胞、 $\alpha$  および  $\beta$  サブユニットを製造する方法、ならびに組換え (すなわち、単離されたまたは実質的に純粋な)  $\alpha$  (とくに  $\alpha_1$  および  $\alpha_7$ ) および  $\beta$  サブユニット (とくに  $\beta_1$ ) が提供される。さらに、サブユニットの組合せ (すなわち、 $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$  および/または  $\alpha_7$  サブユニットと  $\beta_1$  サブユニットの組合せ;  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  および/または  $\beta_4$  サブユニットと  $\alpha_1$  および/または  $\alpha_7$  サブユニットの組合せ) が提供される。



## 【特許請求の範囲】

1. ヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体の $\alpha_4$ または $\alpha_7$ サブユニットをコードするヌクレオチドの配列からなる単離されたDNA.
2. サブユニットは $\alpha_4$ サブユニットである「請求項1」のDNA.
3. DNAは、配列番号：6に掲げたアミノ酸配列もしくはクローンHnAChR $\alpha_4$ . 2 (ATCC受入番号69239) によってコードされるアミノ酸配列をコードするか、またはDNAの5'ヌクレオチドがクローンHnAChR $\alpha_4$ . 1 (ATCC受入番号69152) によってコードされるアミノ酸配列をコードする「請求項2」のDNA.
4. DNAは、配列番号：5に掲げた実質的に全コード配列（ヌクレオチド173-2056）に高い緊縮条件でもしくは、クローンHnAChR $\alpha_4$ . 2 (ATCC受入番号69239) の $\alpha_4$ コード挿入体の実質的に全配列に高い緊縮条件でハイブリダイズするか、またはDNAの5'ヌクレオチドがクローンHnAChR $\alpha_4$ . 1 (ATCC受入番号69152) の $\alpha_4$ コード挿入体の配列に高い緊縮条件下にハイブリダイズする「請求項2」のDNA.
5. DNAは、配列番号：5に掲げたヌクレオチド173-2056、もしくはクローンHnAChR $\alpha_4$ . 2 (ATCC受入番号69239) の $\alpha_4$ コード挿入体と実質的に同一のヌクレオチドを有するか、またはDNAの5'ヌクレオチドがクローンHnAChR $\alpha_4$ . 1 (ATCC受入番号69152) の $\alpha_4$ コード挿入体と実質的に同一の配列を有する「請求項2」のDNA.
6. サブユニットは $\alpha_7$ サブユニットである「請求項1」のDNA.
7. DNAのヌクレオチドは、配列番号：8に掲げたアミノ酸配列をコードする「請求項6」のDNA.
8. DNAのヌクレオチドは、配列番号：7に掲げた実質的に全コード配列（ヌクレオチド73-1581）に高い緊縮条件でハイブリダイズする「請求項6」のDNA.
9. DNAのヌクレオチドは、配列番号：7に掲げたヌクレオチド73-1581と実質的に同一のヌクレオチド配列を有する「請求項6」のDNA.
10. ヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体の $\beta_4$ サブユニットをコ

ードするヌクレオチドからなる単離されたDNA.

11. DNAのヌクレオチドは、配列番号：12に掲げたアミノ酸配列をコードする「請求項10」のDNA.

12. DNAのヌクレオチドは、配列番号：11に掲げた実質的に全コード配列（ヌクレオチド87-1583）に高い緊縮条件でハイブリダイズする「請求項10」のDNA.

13. DNAのヌクレオチドは、配列番号：11に掲げたヌクレオチド87-1583と実質的に同一のヌクレオチド配列を有する「請求項10」のDNA.

14. 「請求項1」のDNAの少なくとも1種を含有する細胞であって、細菌細胞、真核細胞または両生類卵母細胞である細胞.

15. さらに、ヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体の $\beta$ サブユニットをコードする少なくとも1種のDNAを含有する「請求項14」の細胞.

16. さらに、電位依存性カルシウムチャンネルを発現できる特性を有する「請求項15」の細胞.

17.  $\beta$ サブユニットは $\beta_2$ または $\beta_4$ から選択される「請求項15」の細胞.

18.  $\beta$ サブユニットは $\beta_4$ サブユニットである「請求項15」の細胞.

19. 細胞は、DNAによってコードされる1種または2種以上のサブユニットを含有する機能性の神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体を発現する「請求項14」の細胞.

20. 細胞は細菌細胞、真核細胞または両生類卵母細胞であり、「請求項10」のDNAの少なくとも1種を含有する細胞.

21. さらに、ヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体の $\alpha$ サブユニットをコードする少なくとも1種のDNAを含有する「請求項20」の細胞.

22. さらに、電位依存性カルシウムチャンネルを発現できる特性を有する「請求項21」の細胞.

23.  $\alpha$ サブユニットは、 $\alpha_1$ 、 $\alpha_2$ 、 $\alpha_3$ 、 $\alpha_4$ 、 $\alpha_5$ または $\alpha_7$ から選択される「請求項21」の細胞.

24.  $\alpha$ サブユニットは、 $\alpha_4$ または $\alpha_7$ から選択される「請求項21」の細胞.

25. ヒト $\alpha_3$ およびヒト $\beta_4$ サブユニットをコードするDNAを含有する「請求



項21」の細胞。

26. DNAによってコードされる1種または2種以上のサブユニットを含有する機能性の神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体を発現する「請求項20」の細胞。

27. ヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体の活性を修飾する化合物を同定する化合物のスクリーニング方法において、その方法は「請求項15」の試験細胞中の神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体活性に対する化合物の作用を、対照細胞に対する作用またはその化合物の不存在下における細胞の神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体活性と比較して測定することからなり、この場合、対照細胞は実質的に試験細胞と同一であるが対照細胞はニコチン性アセチルコリン受容体を発現しない方法。

28. ヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体の活性を修飾する化合物を同定する化合物のスクリーニング方法において、その方法は「請求項21」の試験細胞中の神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体活性に対する化合物の作用を、対照細胞に対する作用またはその化合物の不存在下における細胞の神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体活性と比較して測定することからなり、この場合、対照細胞は実質的に試験細胞と同一であるが対照細胞はニコチン性アセチルコリン受容体を発現しない方法。

29.  $\alpha_4$ または $\alpha_7$ サブユニットから選択される組換えヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体サブユニット。

30. 「請求項29」の1種または2種以上のサブユニットからなる組換えヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体。

31. さらに、少なくとも1種のヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体 $\beta$ サブユニットからなる「請求項30」のヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体。

32. 組換えヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体 $\beta_4$ サブユニット

33. 「請求項32」のサブユニットからなる組換えヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体。

34. さらに、少なくとも1種のヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容

体 $\alpha$ サブユニットからなる「請求項33」のヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体。

35. 機能性の神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体サブユニットおよびその組合せを同定する方法において (a) 「請求項1」の少なくとも1種のDNA, またはそれと相補性のRNA, および所望によりヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体の少なくとも1種の $\beta$ サブユニットをコードするDNA, またはそれと相補性RNAを真核細胞中に導入し, (b) 工程 (a) の細胞中の神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体活性を評価することからなり, この場合, 活性は上記導入DNAによってコードされる1種または2種以上のサブユニットを含有する受容体によって仲介される方法。

36. 機能性の神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体サブユニットおよびその組合せを同定する方法において (a) 「請求項10」の少なくとも1種のDNA, またはそれと相補性のRNA, およびヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体の少なくとも1種の $\alpha$ サブユニットをコードするDNA, またはそれと相補性のRNAを真核細胞中に導入し, (b) 工程 (a) の細胞中の神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体活性を評価することからなり, この場合, 活性は上記導入DNAによってコードされる1種または2種以上のサブユニットを含有する受容体によって仲介される方法。

37. 「請求項1」のDNAによってコードされる単離mRNA。

38. 「請求項10」のDNAによってコードされる単離mRNA。

39. 「請求項37」のmRNAを含有する細胞。

40. 「請求項38」のmRNAを含有する細胞。

41. 細胞はさらにヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体の $\beta$ サブユニットをコードするmRNAを含有する「請求項39」の細胞。

42. 細胞はさらにヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体の $\alpha$ サブユニットをコードするmRNAを含有する「請求項40」の細胞。

43. 「請求項29」のタンパク質またはその免疫原部分に対して生成された抗

体。

44. 「請求項32」のタンパク質またはその免疫原部分に対して生成された抗

体。

**【発明の詳細な説明】**ヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体組成物およびそれらの使用方法

本発明はヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体タンパク質サブユニットをコードする核酸、ならびにそれらのタンパク質自体に関する。とくにヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体 $\alpha$ サブユニットをコードする核酸、 $\alpha$ サブユニットタンパク質、 $\beta$ サブユニットをコードする核酸、 $\beta$ サブユニットタンパク質、およびそれらの複合体が提供される。

発明の背景

リガンド依存性イオンチャンネルは中枢神経系の細胞間における連絡の手段を提供する。これらのチャンネルは、ある細胞によって放出されるシグナル（たとえば神経伝達物質と呼ばれる化学物質）を、標的細胞の膜に沿って伝導する電気シグナルに変換する。中枢および末梢神経系には様々な神経伝達物質および神経伝達物質受容体が存在する。神経筋および神経細胞起源のニコチン性アセチルコリン受容体（NACHR）を含む5種類のリガンド依存性受容体ファミリーが同定されている〔Stroudら（1990）*Biochemistry* 29:11009-11023〕。しかしながら、多様な受容体が神経系の異なる領域において神経伝達物質または他の調節リガンドに対して異なる応答を発生する様式についてはほとんど理解されていない。

ニコチン性アセチルコリン受容体（NACHR）は、神経筋および神経細胞起源の多重サブユニットタンパク質である。これらの受容体は、神経伝達物質アセチルコリン（ACh）との相互作用によって神経と筋の間および神経細胞間のシナプス伝達を仲介するリガンド依存性イオンチャンネルを形成する。ニコチン性アセチルコリン受容体（NACHR）には様々なサブユニットが存在するので様々なNACHR組成物（すなわち、サブユニットの複合体）が存在する。異なるNACHR組成物は各種リガンドに対して異なる特異性を発揮し、したがって、薬理的に区別される。すなわち、脊椎動物の交感神経節における脊椎動物神経筋接合部および脊椎動物中

中枢神経系に発現されるニコチン性アセチルコリン受容体は、様々なNACHR組成物に結合する各種リガンドの作用に基づいて識別されている。たとえば、神経筋接合部におけるニコチン性アセチルコリン受容体の活性化を遮断するコブラの $\alpha$ -ニューロトキシンは異なる神経細胞に由来する数種の細胞系で発現される一部の神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体の活性化は遮断しない。

筋のNACHRは、化学量論的に $\alpha_2\beta(\gamma$ または $\epsilon)\delta$ の割合の5つのサブユニットから構成される糖タンパク質である。これらのサブユニットは、それぞれ約50~60キロダルトン(kd)の質量を有し、異なる遺伝子によってコードされている。 $\alpha_2\beta(\gamma$ または $\epsilon)\delta$ 複合体は、2個のリガンド結合部位と1個のリガンド依存性膜貫通チャンネルを含む機能性受容体を形成する。コリン作動性アゴニストと相互作用すると、筋ニコチン性AChRはナトリウムイオンを伝導する。ナトリウムイオンの流入は形質膜を横切って維持されている正常イオン勾配を急速に短絡させ、膜は脱分極される。膜を横切る電位差が低下することによって化学シグナルは電気シグナルに変換され、これが神経筋接合部において筋収縮を指示する。

機能性の筋ニコチン性アセチルコリン受容体はこれまで、 $\alpha\beta\delta\gamma$ サブユニット、 $\alpha\beta\gamma$ サブユニット、 $\alpha\beta\delta$ サブユニット、 $\alpha\delta\gamma$ サブユニットまたは $\alpha\delta$ サブユニットにより形成されていて、1つのサブユニットのみで形成された受容体は知られていない[Kurosakiら(1987) FEBS Lett. 214: 253-258; Camachoら(1993) J. Neuroscience 13: 605-613]。これに反し、機能性の神経細胞性AChR (nAChR) は、 $\alpha$ サブユニット単独または $\alpha$ および $\beta$ サブユニットの組合せから形成させることができる。大きい方の $\alpha$ サブユニットは一般にACh結合サブユニットと考えられ、低分子量の $\beta$ サブユニットはAChを結合する能力をもたないことが明確に証明されているわけではないが、一般に構造サブユニットであると考えられている。機能性イオンチャンネルの形成に関与するそれぞれのサブユニットは、それらが生成したチャンネルの構造に寄与する限り、それらのACh結合能力(またはその欠如)とは無関係に「構造」サブユニットである。同じくリガンド依存性イオンチャンネルである神経細胞性AChR (nAChR) は自律神経系の神経節および中枢神経系において(ここでそれらはシグ

ナル伝達を仲介する), 後シナプス部位(ここでそれらは伝達を調節する)ならびに前および外シナプス部位(ここではさらに別の機能をもつと思われる)に発現する。

NACHRをコードする核酸はいくつかの起源から単離されている。これらの研究から得られた情報に基づき、筋、自律神経神経節および中枢神経系において発現されるNACHRは機能的に異なることが少し前に明らかにされている。この機能的多様性の少なくとも一部は存在する多数の異なるNACHRサブユニットによるものと考えられる。しかしながら、とくに神経細胞においてどのようにして(あるいはどの)NACHRサブユニットが結合してユニークなNACHRサブタイプが生成するのかについては不完全な理解しかない。実際、ある種のNACHRサブタイプのみがアルツハイマー病のような疾患に関与していることが証明されている。しかし同種の組織または細胞型からのNACHRが種を越えて同じかどうかは明らかではない。

したがって、ヒト神経細胞性NACHRサブユニットそれぞれをコードする核酸、このようなサブユニットを含む組換え細胞およびそれらから調製される受容体の単離および特徴の解明の必要がある。ヒト神経細胞性AChRの機能を検討し、疾患特異的な薬理活性物質を得るためにはまた単離された(好ましくは精製された)ヒト神経細胞性ニコチン性AChRおよび単離された(好ましくは精製された)ヒト神経細胞性ニコチン性AChRサブユニットを得る必要がある。さらに、このような薬理活性物質を同定するためのアッセイの開発も必要である。

このような核酸、細胞、受容体サブユニットまた受容体組成物の利用が可能になれば、非ヒトnNACHRデータまたはヒトもしくは非ヒト筋もしくは神経節NACHRデータから導かれる予測に基づくヒトnNACHRの構造および機能に関する推論の不確かさが排除されることになる。

したがって、本発明の目的は、ヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体のサブユニットをコードする核酸を単離し、その特徴を明らかにすることにある。本発明の目的はまた、ヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体サブユニットの組換え製造方法を提供することにある。さらに本発明の目的は、精製された受容体サブユニットを提供すること、およびヒト神経細胞性AChRの活性を修飾する化合物を同定するために化合物をスクリーニングする方法を提供するこ

とにある。

これらの目的および他の目的は、明細書および請求の範囲をさらに検討すれば本技術分野の熟練者には明白であろう。

#### 発明の簡単な説明

本発明によれば、神経細胞性NACHRの、新規なヒト $\alpha$ および $\beta$ サブユニットをコードする単離された核酸が提供される。とくに、神経細胞性NACHRのヒト $\alpha_4$ 、 $\alpha_7$ および $\beta_4$ サブユニットをコードする単離されたDNAが提供される。メッセンジャーRNAおよび上述の核酸によりコードされるポリペプチドも提供される。

さらに本発明によれば、 $\alpha_4$ 、 $\alpha_7$ および $\beta_4$ サブユニットを含む組換えヒト神経細胞性ニコチン性AChRサブユニット、ならびにそれらの製造方法が提供される。さらに、少なくとも1種のヒト神経細胞性ニコチン性AChRサブユニットを含有する組換えヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体、ならびにそれらの製造方法が提供される。さらに、宿主細胞によってコードされる1種または2種以上のNACHRサブユニットおよび異種DNAまたはRNA（すなわち、宿主細胞中に導入された、本明細書に記載のDNAまたはRNA）によってコードされる1種または2種以上のnNACHRサブユニットの混合物を含有する組換え神経細胞性ニコチン性AChR、ならびにそれらの製造方法が提供される。

上述のサブユニットをコードするDNAを含有するプラスミドも提供される。上述のDNA、mRNAまたはプラスミドを含有する組換え細胞も本発明によって提供される。このような細胞はたとえば、DNAの複製、ヒトNACHRサブユニットおよび組換え受容体の製造、ならびに1種または2種以上のヒトサブユニットを含む受容体を発現する細胞の製造に有用である。

本発明はまた、機能性のニコチン性アセチルコリン受容体を発現する細胞を同定する方法を提供する。NACHRの活性を修飾する化合物を同定する方法も提供される。

本発明によって提供されるDNA、mRNA、ベクター、受容体サブユニット、受容体サブユニット複合体および細胞は、選ばれた神経細胞性ニコチン性AChRサブユニットおよびそれらの特定の複合体、ならびにその受容体サブユニットに対する抗体の製造を可能にする。これは、その存在が単一のNACHRサブユニットの解析

を妨害する多くの他の受容体タンパク質を実質的に夾雑しない合成または組換え受容体および受容体サブユニットの調製手段を提供するものである。所望の受容体サブユニットが利用できれば、特定の受容体サブタイプに対する薬物の効果の観察、したがってヒトに特異的なまたヒト神経細胞性ニコチン性AChRサブタイプに特異的な試験システムにおける薬物の初期のインビトロスクリーニングの実施が可能になる。

サブユニット特異的抗体が利用できれば、各種サブユニットの、(たとえば正常および疾患脳組織における) 分布および発現密度をモニターする免疫組織化学的技術の適用が可能になる。このような抗体があれば、診断的および治療的適用に使用することもできる。

特定の受容体組成物に対する薬物の作用を測定するためにインビトロで薬物をスクリーニングできれば、受容体サブタイプ特異的なまたは疾患特異的な薬物の開発およびスクリーニングが可能になる。また、単一の受容体サブユニットまたは特定の受容体サブユニット組成物を様々な潜在的アゴニストまたはアンタゴニストで試験することにより、個々のサブユニットの機能および活性に関する付加的情報が得られ、1種または2種以上の受容体サブタイプと極めて特異的に相互作用できる化合物の同定および設計が可能になる。得られた薬物は、様々なサブタイプを発現する細胞でのスクリーニングによって同定された薬物よりも望ましくない副作用は少ない筈である。

さらに、様々な疾患状態の薬物の開発および治療的処置の関連において、ヒトnAChRサブユニットをコードする核酸が利用できれば、ある種の疾患状態の出現に関係するこのような遺伝子の変化(たとえば突然変異)の同定が可能になる。さらに、このような変異を合成DNA配列に特異的に導入し、ついでこれを実験動物またはインビトロアッセイ系に導入してそれらの効果を測定することができるようにした疾患状態の動物モデルの作成が可能になる。

#### 図面の簡単な説明

図1は2つのpCMVプロモーターベースのベクター、pCMV-T7-2およびpCMV-T7-3の制限地図を提示する。

#### 発明の詳細な説明



本発明において、本発明者らは、神経細胞性NACHRの新規なヒト $\alpha$ および $\beta$ サブユニットをコードする核酸を単離し、その特徴を明らかにした。本明細書にはとくに、神経細胞性NACHRのヒト $\alpha_4$ 、 $\alpha_7$ および $\beta_4$ サブユニットをコードする単離されたDNAについて記載される。組換えメッセンジャーRNA (mRNA) および上述の核酸によってコードされる組換えポリペプチドも提供される。

本明細書において用いられる、DNA、RNA、ポリペプチドまたはタンパク質の修飾語としての単離された（または、実質的に純粋な）の語は、そのように指摘されたDNA、RNA、ポリペプチドまたはタンパク質がそれらのインビボにおける細胞性環境から人工的努力によって分離されたことを意味する。したがって、本明細書で用いられる、単離された（または、実質的に純粋な）DNAの語は本技術分野の熟練者によって使用される標準技術に従って精製されたDNAを意味する [たとえばManiatisら (1982) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY参照]。

同様に、本明細書に用いられる、DNA、RNA、ポリペプチドまたはタンパク質の修飾語としての「組換え」の語は、そのように指摘されたDNA、RNA、ポリペプチドまたはタンパク質が人工的努力によって、たとえばクローニング、組換え発現等によって調製されたことを意味する。したがって、本明細書で用いられる組換えタンパク質の語はたとえば、人工的努力により、宿主に添加された核酸のその組換え宿主による発現で産生されたタンパク質を意味する。

本明細書で用いられるヒト $\alpha$ サブユニット遺伝子とは、ヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体の $\alpha$ サブユニットをコードする遺伝子である。 $\alpha$ サブユニットはAChが結合するNACHRのサブユニットである。Denerisら [Tips (1991) 12:34-40] によれば推定nNACHRサブユニットに「 $\alpha$ 」の名が割当てられたのは、そのサブユニットの推定細胞外ドメイン中における電気魚 $\alpha$ サブユニット [Nodaら (1982) Nature 299:793-797参照] のシステイン192および193と同種の隣接システイン残基の保存に基づくものである。本明細書で用いられる $\alpha$ サブユニットは、本明細書に開示されたnNACHRの $\alpha$ サブユニットをコードする核酸（または寄託クローン）の少なくとも一つに高い緊縮条件下にハイブリダイズする核酸によってコードされるヒトnNACHRサブユニット

を意味する。 $\alpha$ サブユニットはまた、生理学的条件および生理学的濃度で、 $\beta$ サブユニットの任意の存在下に（すなわち一部の $\alpha$ サブユニットは単独で機能するが、他は $\beta$ サブユニットの存在を必要とする）AChに結合し、一般的には、本明細書に記載の方法または本技術分野の熟練者に知られた方法で評価して機能性のAChRを形成する。

また上に定義した $\alpha$ サブユニットをコードするが、遺伝子コードの縮重によって、特定のハイブリダイゼーション条件では開示された核酸または寄託されたクローンに必ずしもハイブリダイズしない核酸によってコードされる $\alpha$ サブユニットも意図される。このようなサブユニットも、一般的には1種または2種以上の $\beta$ サブユニットとともに、本明細書に記載の方法または本技術分野の熟練者に知られた方法で評価して機能性の受容体の形成に参画する。通常、 $\alpha$ サブユニットが別のスプライシングから生じるRNAによってコードされた $\alpha$ サブユニット（すなわちスプライス変異体）ではない限り、 $\alpha$ をコードする核酸とそれによりコードされる $\alpha$ サブユニットは、ここに開示もしくは寄託された $\alpha$ サブユニット核酸（およびそれによってコードされたタンパク質）の少なくとも一つと、実質的な配列ホモロジーを有する。スプライス変異体をコードするDNAまたはRNAは本発明で提供されたDNAまたはRNAとの全体的なホモロジーは90%未満であってもよいが、ここに記載されたDNAフラグメントまたは寄託されたクローンとほぼ100%のホモロジーを示す領域を包含し、開始および終止コドンを含み機能性 $\alpha$ サブユニットをコードするオープンリーディングフレームをコードするものである。

本明細書で用いられるスプライス変異体の語はゲノムDNAの一次転写体の差別的プロセッシングによって生じる変異NACHRサブユニットをコードする核酸を意味し、これにより2以上のタイプのmRNAの産生が起こる。差別的プロセッシングを受けたゲノムDNAに由来するcDNAは、アミノ酸が完全に同一な領域と異なるアミノ酸配列を有する領域とをもつNACHRサブユニットをコードすることになる。すなわち、同じゲノム配列が多重の類似したmRNAおよびタンパク質の産生を導くことができる。得られたmRNAおよびタンパク質の両者を本明細書では「スプライス変異体」と呼ぶ。

本明細書で用いられるハイブリダイゼーションの緊縮度の語はポリ核酸ハイブリドが安定な条件を意味する。本技術分野の熟練者には既知のように、ハイブリドの安定性はそのハイブリドの融点 ( $T_m$ ) に反映される。 $T_m$ は次式、

$$81.5^{\circ}\text{C} - 16.6 (\log_{10} [\text{Na}^+]) + 0.41 (\% \text{G} + \text{C}) - 600/l$$

で近似できる。式中、 $l$ はヌクレオチド中のハイブリドの長さである。 $T_m$ は配列ホモロジーが1%低下する毎に約1~1.5℃ずつ低下する。一般に、ハイブリドの安定性はナトリウムイオン濃度および温度の関数である。通常、ハイブリダイゼーション反応は低い緊縮条件下に行われ、ついで異なるより高い緊縮度で洗浄される。ハイブリダイゼーションの緊縮度の値はこのような洗浄条件に関係する。すなわち、ここでは以下のように使用される。

(1) 高い緊縮度は、0.018M NaCl中65℃で安定なハイブリドを形成する核酸配列のみのハイブリダイゼーションを可能にする条件を意味する（すなわち、ハイブリドが0.018M NaCl中65℃で不安定であれば、それはここで意図されたような高い緊縮条件下に安定ではないことになる）。高い緊縮条件はたとえば、50%ホルムアミド、5×デンハルト溶液、5×SSPE、0.2%SDS中42℃でのハイブリダイゼーション、ついで0.1×SSPEおよび0.1%SDS中65℃での洗浄によって提供できる。

(2) 中等度の緊縮度は50%ホルムアミド、5×デンハルト溶液、5×SSPE、0.2%SDS中42℃でのハイブリダイゼーション、ついで0.2×SSPE、0.2%SDS中65℃での洗浄と同等の条件を意味する。

(3) 低い緊縮度は10%ホルムアミド、5×デンハルト溶液、6×SSPE、0.2%SDS中でのハイブリダイゼーション、ついで1×SSPE、0.2%SDS中50℃での洗浄と同等の条件を意味する。

これらの条件は各種の緩衝液および温度を用いて再現することが可能であり、また必ずしも正確である必要はないものである。

デンハルト溶液およびSSPE（たとえば、Sambrook, Fritsch & Maniatis, in: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989参照）は他の適当なハイブリダイゼーション緩衝液と同様に、本技術分野の熟練者にはよく知られている。たとえば、SSPEは、pH7.4のリン酸

緩衝0.18M NaClである。SSPEはたとえば、175.3gのNaCl、27.6gの $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ および7.4gのEDTAを800mlの水に溶解し、pHを7.4に調整しついで水を加えて1Lとした20×保存溶液として調製することが可能である。デンハルト溶液 [Denhardt (1966) Biochem.Biophys.Comm. 23:641参照] は、たとえば、5gのFicoll (400型, Pharmacia LKB Biotechnology, INC., Piscataway NJ), 5gのポリビニルピロリドン, 5gのウシ血清アルブミン (分画V; Sigma, St.Louis MO) を混合し、水で500mlとし、ろ過して粒状物質を除去することにより50×保存溶液として調製できる。

本明細書で用いられる「実質的な配列ホモロジー」の句は、本明細書に開示された実際の配列からわずかな重要ではない配列変動しかないDNAのヌクレオチド配列、RNAのリボヌクレオチド配列、またはタンパク質のアミノ酸配列を意味する。実質的な配列ホモロジーを有する種は開示された配列と均等であるとみなされ、添付の請求の範囲内に包含される。この場合、「わずかな重要ではない配列変動」とは、「相同な」配列、すなわち本明細書に開示され請求されたDNA、RNAまたはタンパク質と実質的なホモロジーを有する配列が本明細書に開示され請求された配列と機能的に均等であることを意味する。機能的に均等な配列は、本明細書に開示され請求された核酸およびアミノ酸組成物と実質的に同一の組成物を製造するために実質的に同様に機能する。とくに、機能的に均等な核酸は本明細書に開示されたのと同じタンパク質をコードするか、または保存的なアミノ酸変化、たとえば非極性残基の他の非極性残基による置換または荷電残基の同じ荷電残基による置換を有するタンパク質をコードする。これらの変化には、本技術分野の熟練者によりタンパク質の三次構造を実質的に変化させない変化として知られている変化が包含される。

実際上は、実質的に同じ配列の語は、2つのタンパク質をコードするDNAまたはRNAが高い緊縮条件下にハイブリダイズし、同一のアミノ酸配列を有するか、またはそれらの構造もしくは機能を変化させない配列変化を有するタンパク質をコードすることを意味する。ここで用いられる実質的に同一のヌクレオチド配列は少なくとも約90%の同一性をもち、実質的に同一のアミノ酸配列は95%を超えるアミノ酸同一性を有する。しかしながら、スプライス変異体として生じた

上記レベルに満たないホモロジーを含むタンパク質（およびこのようなタンパク質をコードするDNAまたはRNA）または保存的アミノ酸置換（または縮重コドンの置換）によって修飾されたタンパク質（およびこのようなタンパク質をコードするDNAまたはRNA）は本発明の範囲内に含む意図である。

本明細書で用いられる「 $\alpha_4$ サブユニットDNA」の語は同一の名称の神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体サブユニットをコードするDNAを意味する。このようなDNAは多くの方法で、たとえば

そのDNAは配列番号：6に掲げたアミノ酸配列をコードする、または

そのDNAはATCC受入番号69239号として寄託されたクローンHnAChR $\alpha_4$ 、

2によってコードされるアミノ酸配列をコードする、または

そのDNAの5'ヌクレオチドは、ATCC受入番号69152号として寄託されたクローンHnAChR $\alpha_4$ 、1によってコードされるアミノ酸配列をコードすることにより特性づけることができる。

現時点で好ましい $\alpha_4$ -コードDNAは次のように、すなわち、

そのDNAは配列番号：5に掲げたコード配列（好ましくはその実質的に全コード配列、すなわちヌクレオチド173-2056）に高い緊縮条件下にハイブリダイズできる、または

そのDNAは、高い緊縮条件下にATCC受入番号69239号として寄託されたクローンHnAChR $\alpha_4$ 、2の $\alpha_4$ -コード挿入体の配列（好ましくはその実質的に全配列）にハイブリダイズできる、または

そのDNAの5'ヌクレオチドは高い緊縮条件下にATCC受入番号69152号として寄託されたクローンHnAChR $\alpha_4$ 、1の $\alpha_4$ -コード挿入体の配列にハイブリダイズできることにより特性づけることができる。

とくに好ましい本発明の $\alpha_4$ -コードDNAは次のように、すなわち、

配列番号：5に掲げたコード領域（すなわちそのヌクレオチド173-2056）と実質的に同一のヌクレオチド配列を有するDNA、または、

ATCC受入番号69239号として寄託されたクローンHnAChR $\alpha_4$ 、2の $\alpha_4$ -コード挿入体と実質的に同一のヌクレオチド配列を有するDNA、または、

ATCC受入番号69152号として寄託されたクローンHnAChR $\alpha_4$ 、1の $\alpha_4$ -

コード挿入体と実質的に同一のヌクレオチド配列を有するDNAとして特性づけられる。

通常、 $\alpha_4$ サブユニットがスプライス変異体として生じるのでなければ、 $\alpha_4$ -コードDNAは本明細書に開示され請求された $\alpha_4$ -DNAと実質的な（すなわち約90%を越える）配列ホモロジーを有する。スプライス変異体をコードするDNAもしくはRNAはここに提供されたDNAまたはRNAと全体的配列に90%未満のホモロジーをもてばよいが、このようなスプライス変異体は上述のDNAとほぼ100%のホモロジーの領域を含むことになる。

本明細書で用いられる「 $\alpha_7$ サブユニットDNA」の語は同一の名称の神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体サブユニットをコードするDNAを意味する。このようなDNAは多くの方法で、たとえばそのDNAのヌクレオチドは配列番号：8に掲げたアミノ酸配列をコードすることにより特性づけることができる。現時点で好ましい $\alpha_7$ -コードDNAは配列番号：7に掲げたコード配列（好ましくはその実質的に全コード配列、すなわち、ヌクレオチド73-1581）に高い緊縮条件下にハイブリダイズするDNAとして特性づけることができる。とくに好ましい本発明の $\alpha_7$ -コードDNAは配列番号：7に掲げたコード配列（すなわち、そのヌクレオチド73-1581）と実質的に同一のヌクレオチド配列をもつDNAとして特性づけられる。

通常、 $\alpha_7$ サブユニットがスプライス変異体として生じるのでなければ、 $\alpha_7$ -コードDNAは本明細書に開示され請求された $\alpha_7$ -DNAと実質的な（すなわち約90%を越える）配列ホモロジーを共有する。スプライス変異体をコードするDNAまたはRNAはここに提供されたDNAまたはRNAと全体的配列に90%未満のホモロジーをもてばよいが、このようなDNAは上述のDNAとほぼ100%のホモロジーの領域を含むことになる。

上述のDNAから誘導される $\alpha_7$ サブユニットは神経毒素である $\alpha$ -ブンガロトキシシン（ $\alpha$ -bgtx）に結合することが期待される。 $\alpha_7$ サブユニットを含むAChRの活性は $\alpha$ -bgtxとの相互作用で阻害される筈である。配列番号：8に掲げたアミノ酸残基210から217は $\alpha$ -bgtxの結合に重要な要素であると考えられる〔たとえば、Chargeauxら（1992）13：299-301参照〕。

本明細書で用いられるヒト $\beta$ サブユニット遺伝子とはヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体の $\beta$ サブユニットをコードする遺伝子である。Denerisら（前出）によれば推定nNACHRサブユニットに「 $\beta$ 」の名称が割当てられたのは隣接システイン残基（それらは $\alpha$ サブユニットの特徴である）の欠如に基づくものである。 $\beta$ サブユニットは構造NACHRサブユニットと呼ばれることが多い（ $\beta$ サブユニットはACh結合性をもつことが可能であるが）。 $\beta$ サブユニットが適当な $\alpha$ サブユニットと複合することによって機能性受容体の形成が導かれる。本明細書で用いられる $\beta$ サブユニットの語は、高い緊縮条件下において、本明細書に開示された少なくとも一つのnNACHRコードDNA（もしくは寄託されたクローン）にハイブリダイズするDNAによってコードされるnNACHRサブユニットを意味する。 $\beta$ サブユニットは適当な $\alpha$ サブユニットと、本明細書に記載の方法または本技術分野の熟練者に知られた方法で評価して、機能性のNACHRを形成する。

また上に定義した $\beta$ サブユニットをコードするDNAによってコードされるが、遺伝子コードの縮重により、特定のハイブリダイゼーション条件では、開示されたDNAまたは寄託されたクローンに必ずしもハイブリダイズしない $\beta$ サブユニットも意図される。このようなサブユニットも、適当な $\alpha$ サブユニットと結合し、本明細書に記載の方法または本技術分野の熟練者に知られた方法で評価して機能性の受容体を形成する。通常、スプライス変異体として生じるRNAによりコードされた $\beta$ サブユニットではない限り、 $\beta$ をコードするDNAとそれによりコードされる $\beta$ サブユニットは、ここに記載された $\beta$ をコードするDNAおよび $\beta$ サブユニットタンパク質と実質的な配列ホモロジーを共有する。スプライス変異体をコードするDNAまたはRNAは、ここに提供されるDNAまたはRNAとの全体的なホモロジーは90%未満であるが、ここに記載されたDNAとほぼ100%のホモロジーを示す領域を包含する。

本明細書で用いられる「 $\beta$ サブユニットDNA」の語は同一名称の神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体サブユニットをコードするDNAを意味する。このようなDNAは多くの方法で、たとえばそのDNAのヌクレオチドが配列番号：12に掲げたアミノ酸配列をコードすることにより特性づけることができる。現時点で好ましい $\beta$ サブユニットコードDNAは配列番号：11に掲げたコード配列（好ましく

はその実質的に全コード配列、すなわちヌクレオチド87-1583)に高い緊縮条件下にハイブリダイズするDNAとして特性づけることができる。とくに好ましい本発明の $\beta_4$ コードDNAは配列番号: 11に掲げた配列と実質的に同一のヌクレオチド配列を有するDNAとして特性づけられる。

通常、 $\beta_4$ サブユニットがスプライス変異体として生じるのでなければ、 $\beta_4$ -コードDNAはここに記載または寄託された $\beta_4$ -DNAと実質的な(すなわち、約90%を越える)配列ホモロジーを有する。スプライス変異体をコードするDNAもしくはRNAはここに提供されたDNAもしくはRNAと全体的配列に90%未満のホモロジーをもてばよいが、このようなDNAは上述のDNAとほぼ100%のホモロジーの領域を含むことになる。

ヒト神経細胞性ニコチン性AChR $\alpha$ および $\beta$ サブユニットをコードするDNAは、適当なハイブリダイゼーション条件下に適当なヒトcDNAまたはヒトゲノムライブラリーを、本明細書に開示されたDNA(配列番号: 5, 7または11のいずれかから誘導されるヌクレオチドを含む)または本明細書に記載の寄託されたクローンのいずれか(たとえば、ATCC受付番号69239号または69152号)でスクリーニングすることによって単離できる。適当なライブラリーは神経組織サンプル、海馬組織または細胞系たとえばヒト神経芽細胞腫細胞系IMR32(ATCC受付番号CCL127号)等から調製できる。ライブラリーは好ましくはその全サブユニットコード配列を包含するDNAの部分でスクリーニングされ、またライブラリーは適当なプローブでスクリーニングできる。

ここで用いられるプローブは、配列番号: 1, 3, 5, 7, 9もしくは11のいずれかまたは本明細書に記載の寄託されたクローンのいずれか(たとえば、ATCC受付番号69239号または69152号)の中に認められる任意の14塩基と同一(またはそれと相補性)の少なくとも14個の連続塩基を含むヌクレオチドの配列を有する一本鎖DNAまたはRNAである。プローブを構築するのに好ましい領域には、膜貫通ドメインをコードすると推定される配列、細胞内ループをコードすると推定される配列、シグナル配列、アセチルコリン(ACh)および $\alpha$ -ブングアロトキシン( $\alpha$ -bgtx)結合部位等がある。アミノ酸210-220は通常、AChおよび $\alpha$ -bgtxの結合に関与する。このような領域からなると推測さ



れる他の好ましいプローブのための凡そのアミノ酸残基を以下の表に示す。

サブユニット	シグナル配列	TMD1*	TMD2	TMD3	TMD4	細胞内ループ
$\alpha_2$	1-55	264-289	297-320	326-350	444-515	351-443
$\alpha_3$	1-30	240-265	273-296	302-326	459-480	327-458
$\alpha_4$	1-33	241-269	275-289	303-330	593-618	594-617
$\alpha_7$	1-23	229-256	262-284	290-317	462-487	318-461
$\beta_2$	1-25	234-259	267-288	295-320	453-477	321-452
$\beta_4$	1-23	234-258	264-285	290-319	454-478	320-453

\* TMD = 膜貫通ドメイン

別法として、DNAの部分は特定のライブラリー中の選択されたフラグメントを増幅するためにプライマーとして使用できる。

ライブラリーのスクリーニング後に、ハイブリダイゼーションシグナルを検出することによって陽性クローンが同定される。同定されたクローンは制限酵素地

図の作成および／またはDNA配列解析によって特性づけられ、ついで本明細書に掲げられた配列または本明細書に記載された寄託クローンとの比較によりそれらが完全な $\alpha$ または $\beta$ サブユニットをコードするDNAを含むか否かを確認するために試験する。選ばれたクローンが不完全である場合には、それらを用いて重複するクローンを得るために同一のまたは別のライブラリーを再スクリーニングする。所望により全 $\alpha$ または $\beta$ サブユニットをコードする重複クローンが得られるまで、ライブラリーを陽性クローンで再スクリーニングすることができる。ライブラリーがcDNAライブラリーである場合には、重複クローンはオープンリーディングフレームを包含する。ライブラリーがゲノムである場合には、重複クローンはエクソンおよびイントロンを包含する。いずれの場合も、完全クローンは本発明によって提供されるDNAおよびコードされたタンパク質との比較によって同定できる。

様々なヒトnNACHR $\alpha$ および $\beta$ サブユニットをコードする相補性DNAクローンが単離されている。各サブユニットは異なる遺伝子によってコードされているものと思われる。ここに提供されたDNAクローンは、各サブユニットをコードするゲノムクローンの単離に、また異なる神経組織から調製されたライブラリーをスクリーニングすることによってスプライス変異体の単離に使用できる。本技術分野においてよく知られている核酸増幅技術がヒトNACHRサブユニットのスプライス変異体の探索に用いられる。これは、分岐配列を取囲むDNA配列に基づくオリゴヌクレオチドをヒトRNAまたはゲノムDNAを増幅するためのプライマーとして用いることによって達成される。増幅生成物のサイズおよび配列決定により、スプライス変異体の存在を明らかにすることができる。さらに、ハイブリダイゼーションによるヒトゲノムDNA配列の単離により、ヒトNACHRサブユニットをコードする転写体の異なるスプライス変異体に相当する、イントロンで分離された多重エクソンを含有するDNAを得ることができる。

すべてのサブユニットがすべての神経組織またはすべての脳部分で発現される

わけではないことが明らかにされている。すなわち、特定のサブユニットまたはこのようなサブユニットのスプライス変異体を単離するためには、様々な神経細

胞または神経組織から調製されたライブラリーをスクリーニングすることが好ましい。各サブユニットをコードするDNAを得るための好ましいライブラリーには、ヒトの $\alpha_4$ および $\alpha_5$ コードDNAを単離するための海馬、ヒト $\alpha_3$ 、 $\alpha_5$ 、 $\alpha_7$ および $\beta$ コードDNAを単離するためのIMR32（ヒトの神経芽細胞腫細胞、ATCC受入番号：CCL 127）、 $\alpha_2$ および $\beta_2$ コードDNAを単離するための視床等が包含される。

ヒト神経細胞性ニコチン性AChRの発現の分布は、このような受容体のラットにおける分布とは異なるように思われる。たとえばラット $\alpha_4$ サブユニットをコードするRNAはラット視床に豊富であるが、ラット海馬には豊富ではない〔たとえば、Wadaら（1989）J. Comp. Neuro]. 284:314-335参照〕。しかしながらヒト視床ライブラリーからは $\alpha_4$ コードクローンを得ることができなかった。その代わりヒト $\alpha_4$ クローンは結局ヒト海馬ライブラリーから得られた。すなわちヒトおよびラットにおける $\alpha_4$ -nAChRサブユニットの分布は全く異なるように思われる。

ラット $\alpha_3$ サブユニットは視床で豊富に発現され、脳幹で弱く発現されるCNS-関連サブユニットと考えられる〔たとえば、Boulterら（1986）Nature 319:368-374；Boulterら（1987）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7763-7767；Wadaら（1989）J. Comp. Neuro]. 284:314-335参照〕。しかしながら、ヒトニコチン性AChR $\alpha_3$ サブユニットをコードするDNAをクローニングする努力にもかかわらず、視床ライブラリーを含めて数種のヒトライブラリーのスクリーニングは成功しなかった。驚くべきことに、ヒト $\alpha_3$ サブユニットをコードするクローンは最終的に、ほとんど機能性ニコチン性アセチルコリン受容体の発現はないと報告されていた脳幹ライブラリーおよびIMR細胞から得られた〔たとえば、Gottiら（1986）Biochem. Biophys. Res. Commun. 137:1141-1147、およびClementiら（1986）J. Neurochem. 47:291-297参照〕。

ラット $\alpha_7$ サブユニット転写体は、海馬で豊富に発現されると報告されている

〔Seguelaら（1993）J. Neurosci. 13:596-604参照〕。ヒト $\alpha_7$ サ

ブユニットをコードするDNAをヒト海馬ライブラリー（ $1 \times 10^6$ リコンビナント）からクローニングする努力は成功しなかった。驚くべきことに、ヒトNACHR $\alpha$ サブユニットをコードするクローンは最終的にIMR細胞cDNAライブラリーから得られた。

上述のヌクレオチド配列は、さらに操作するためベクター中に導入することができる。本明細書で用いられるベクター（またはプラスミド）は異種DNAをその発現または複製用に細胞中に導入するために使用される個別の要素を意味する。このようなビヒクルの選択および使用は本技術分野の技術レベル内にある。

本明細書で用いられる異種または外来DNAおよびRNAは互いに同義で、それが存在する細胞のゲノムの部分として天然には存在しないDNAまたはRNAあるいはそれが天然に存在する位置とは異なるゲノム中の位置に見出されるDNAまたはRNAを意味する。通常、異種または外来DNAおよびRNAとは、宿主細胞に内因性ではなくその細胞に人工的に導入されたDNAまたはRNAを意味する。異種DNAの例にはヒト神経細胞性ニコチン性AChRサブユニットをコードするDNA、転写、翻訳または他の調節可能な生物学的プロセスに影響して内因性DNAの発現を仲介または変化させるRNAまたはタンパク質をコードするDNA等が包含される。異種DNAを発現する細胞は同一のまたは異なる発現産物をコードするDNAを含有することができる。異種DNAは必ずしも発現される必要はなく、宿主細胞のゲノム中に挿入されていてもまたエピソードとして保持されていてもよい。

発現ベクターはDNAを発現できるベクターであり、そのDNAはこのようなDNAフラグメントの発現に影響できるたとえばプロモーター領域のような調節配列と操作性に連結している。すなわち、発現ベクターは適当な宿主細胞に導入するとクローン化された核酸の発現を生じる組換えDNAまたはRNA構築体、たとえばプラスミド、ファージ、組換えウイルスまたは他のベクターを意味する。適当な発現ベクターは本技術分野の熟練者にはよく知られていて、真核細胞および／または原核細胞中で複製可能なベクターおよびエピソード性を維持するベクターまたは宿主ゲノム中に組み込まれるベクターを包含する。本発明のAChRサブユニットの真核細胞とくに哺乳類動物細胞中での発現に現時点で好ましいプラスミドには、

サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター含有ベクター、たとえばpCMV, pcDNA 1等、ならびにMMTVプロモーター含有ベクターたとえばpMAMneo等が包含される。

本発明に用いられるプロモーター領域の語は、それが操作性に連結するDNAの転写を制御するDNAのセグメントを意味する。プロモーター領域はRNAポリメラーゼの認識、結合および転写開始に十分な特異的配列を包含する。プロモーター領域のこの部分はプロモーターと呼ばれる。さらにプロモーター領域はRNAのこの認識、結合および転写開始活性を調節する配列を包含する。これらの配列はシスに働く因子でもトランスに働く因子に応答性であってもよい。プロモーターはその調節の性質により、構成的でも調節的でもよい。本発明の実施に際して使用が意図されるプロモーターの例にはSV40初期プロモーター、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター、マウス乳癌ウイルス (MMTV) ステロイド誘導性プロモーター、モロニーマウス白血病ウイルス (MLV) プロモーター等が包含される。ここで用いられる「操作性に連結」の語は、ヌクレオチドの調節およびエフェクター配列、たとえばプロモーター、エンハンサー、転写および翻訳停止部位、ならびに他のシグナル配列と核酸の機能的関係を意味する。たとえば、プロモーターへの核酸の操作性連結とは、このような核酸の転写がその核酸を特異的に認識し、それに結合し、それを転写するRNAポリメラーゼによってプロモーターから開始されるような核酸とプロモーターの間の物理的および機能的関係を意味する。発現および／またはインビトロ転写を至適化するためには、余分の潜在的な別の翻訳開始（すなわちスタート）コドンまたは転写もしくは翻訳のいずれかのレベルでの発現の妨害または低下を生じる他の配列を除去するため、クローンの5' および／または3' 非翻訳部分を排除または変化させることが必要な場合がある。別法としてコンセンサスリボソーム結合部位〔たとえば、Kozak (1991) J. Biol. Chem. 266:19867-19870参照〕を開始コドンの5' 直前に挿入して発現を増強することができる。さらに、両生生物の卵母細胞中でのNACHRの発現では、至適なタンパク質の産生のために、サブユニットコード配列をアフリカツメガエルの $\beta$ グロビン遺伝子5' および3' 非翻訳配列で取り囲むことが望ましい。たとえば、NACHRサブユニットコード配列は、ベクターpSP 64 T [Krieg & Melton (1984) Nucl. Acids Res. 12:7057-7070

参照] , pSP 64の改良型 (Promega, Madison, WIから入手可能) 中に挿入できる。コード配列はSP6プロモーターの下流に位置する $\beta$ グロビン遺伝子5' および3' 非翻訳配列の間に挿入される。ついで得られたベクターからインビトロ転写体を生成できる。このような修飾の所望度 (または必要性) は経験的に決定することができる。

ここに記載されたクローン化配列の発現を促進するためには、様々なプロモーター、エンハンサー、シグナル配列等を使用できることは、本技術分野の熟練者にはよく知られている。さらに、与えられた構築体に用いられる調節要素は同じ起源から得る必要はないことも容易にわかる。実際に、与えられた構築体に用いられる調節要素は異なる起源から得ることが可能で、特定の発現構築体中に調節要素の様々な組合せを結合させることができる。

本明細書で用いられる発現の語はポリ核酸をmRNAに転写し、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質に翻訳する過程を意味する。ポリ核酸がゲノムDNAに由来するならば、発現は、適当な真核宿主細胞または生物が選択された場合、そのmRNAのスプライシングを包含する。

哺乳類細胞のトランスフェクションにとくに好ましいベクターは、SV40初期プロモーター、マウスdhfr遺伝子、SV40ポリアデニル化およびスプライシング部位ならびにそのベクターを細菌中に保持するために必要な配列を含有するpSV2 dhfrベクター、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーターベースのベクターたとえばpCDNA1 (Invitrogen, San Diego, CA) , およびMMTVプロモーターベースのベクターたとえばpMAMneo (Clontech, Palo Alto, CA) ならびにそれらの修飾ベクターである。

ヒト神経細胞性NACHRサブユニットをコードする全長DNAはベクターpCMV-T7 , すなわちCMVプロモーター/エンハンサー、プロモーターの直ぐ下流に位置するSV40スプライス/ドナー部位、スプライス/ドナー部位の下流にポリリンカー、続いてSV40ポリアデニル化シグナルを含有するpUC 19ベースの哺乳類細胞発現ベクター中に挿入された。NACHRサブユニットDNAはCMVプロモーターとSV40ポリアデニル化シグナルの間に配置すると、その構築体でトランスフェクトされた哺乳類宿主細胞中での外来DNAの構成的発現が与えられる。ヒト

NACHRサブユニットをコードするDNAの哺乳類細胞中での誘導可能な発現には、DNAをpMSGのようなプラスミド中に挿入することができる。このプラスミドは機能性に連結した外来DNAのステロイド誘導性発現のためのマウス乳癌ウイルス (MMTV) プロモーターを含有する。宿主細胞が糖質コルチコイド (すなわちMMTVプロモーターのインデューサー) の細胞中への取り込みに必要な内因性糖質コルチコイド受容体を発現しない場合は、さらに糖質コルチコイド受容体をコードするDNA (ATCC受入番号67200号) で細胞をトランスフェクトする必要がある。ヒト $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$ ,  $\alpha_7$ ,  $\beta_2$ ならびに $\beta_4$ をコードする全長ヒトDNAクローンもインビトロ転写体の合成のために、pIBI 24 (International Biotechnologies, Inc., New Haven) またはpCMV-T7-2中にサブクローニングされた。

本発明の他の実施態様によれば、上述のポリ核酸 (すなわちDNAまたはmRNA) を含有する細胞が提供される。DNAを複製してnACHRサブユニットを製造するためには細菌、酵母、両生および哺乳動物細胞のような宿主細胞を使用することができる。本明細書に記載の発現ベクターの構築、インビトロ転写体の調製、哺乳類細胞中へのDNAのトランスフェクション、卵母細胞の注入および受容体発現および機能の評価のための電気生理学および他の解析の方法は、PCT出願PCT/US91/02311 (現在はWO91/15602として公開)、PCT/US91/05625 (現在はWO92/02639として公開)、PCT/US92/11090 (現在はWO93/13423として公開)、係属中のUS出願07/504,455号、07/563,751号および07/812,254号にも記載されている。これらの出願それぞれの主題はその全文を参照により本明細書に導入する。

クローン化されたDNAの適当な発現ベクターへの導入、プラスミドベクターまたはそれぞれ1もしくは2種以上の個別の遺伝子をコードするプラスミドベクターの組合せあるいは線状DNAによる真核細胞のトランスフェクション、ならびにトランスフェクトされた細胞の選択は本技術分野においてよく知られている (たとえば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989参照)。異種DNAは本技術分野の熟練者に知られた任意の方法、たとえば異種DNAをコードするベクターでの $\text{CaPO}_4$ 沈殿 [たとえば、Wiglerら (1979) Proc.Natl.Acad.Sci.USA76:1373

ー1376参照] またはリポフェクタミン (CIBCO BRL# 18324-012) によるトランスフェクションによって宿主細胞導入できる。組換え細胞はついでDNAによってコードされたサブユニットが発現される条件下に培養できる。好ましい細胞には哺乳類細胞 (たとえば, HEK293, CHO, GH3およびLtk細胞), 酵母細胞 (たとえばメチロトロフ酵母細胞たとえば*Pichia pastoris*), 細菌細胞 (たとえば*Escherichia coli*) 等が含まれる。とくに好ましい細胞は内因性または外因性電位依存性カルシウムチャンネルも発現できる細胞である (たとえば, RCT出願US92/06903, 現在はWO93/04083として公開)。

本発明によって提供される核酸は, 酵母細胞 [たとえば, *P. pastoris* (米国特許第4,882,279号, 第4,837,148号, 第4,929,555号および第4,855,231号参照), *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *Hansenula polymorpha*等] を含めて真核細胞中において発現させることができるが, 本発明によって提供されるヒト神経細胞性ニコチン性AChRサブユニットをコードする核酸の発現のためには, 市販品を入手できるシステムおよび他の本技術分野の熟練者に知られているシステムを含めて哺乳類発現システムが現時点では好ましい。DNAのRNA転写体の発現にはアフリカツメガエル卵母細胞が好ましい。

好ましい実施態様においては, DNAをベクター中にライゲートし, ついで適当な宿主細胞中に導入して特定のヒトnAChR受容体サブユニットまたはサブユニットの特定の複合体を発現するトランスフォームされた細胞系を作成する。得られた細胞系をついで大量に産生させて, 受容体機能に対する薬物の効果の再現性ある定量的解析に使用することができる。他の実施態様においては, 各サブユニットをコードするDNAのインビトロ転写によりmRNAを産生させる。このmRNAはついで, 単一のサブユニットクローンからのものであれクローンの組合せからのものであれ, アフリカツメガエル卵母細胞に注入することが可能で, ここでmRNAにヒト受容体サブユニットの合成を行わせると, それらが機能性受容体を形成する。別法として, サブユニットをコードする核酸を直接卵母細胞に注入して, 機能性の受容体を発現させることのできる。トランスフェクトした哺乳類細胞または注入を行った卵母細胞はついで, 本発明によって提供される薬物のスクリーニング



方法に使用できる。

ヒト神経細胞性ニコチン性AChRの任意のサブユニットをコードするクローン化された全長DNAは、真核細胞中での発現のためにプラスミドベクター中に導入することができる。このDNAはゲノムDNAでもcDNAでもよい。宿主細胞は少なくとも1種のヒト神経細胞性ニコチン性AChRサブユニットをコードするプラスミド1種またはその組合せを用いてトランスフェクトされる。

DNAまたはRNAを導入できる真核細胞はこのようなDNAまたはRNAによってトランスフェクト可能な細胞、あるいはこのようなDNAまたはRNAを注入できる細胞である。好ましい細胞は、一過性にもしくは安定にトランスフェクトが可能で、またDNAおよびRNAを発現できる細胞である。現時点で最も好ましい細胞は、異種DNAによってコードされる1種または2種以上のサブユニットからなる組換えまたは異種ヒト神経細胞性ニコチン性AChRを形成できる細胞である。このような細胞は経験的に同定できるし、またトランスフェクトや注入が容易であることが知られている細胞の中から選択できる。

DNAの導入に用いられる細胞の例には哺乳類起源の細胞〔たとえば、COS細胞、マウスL細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、ヒト胚腎臓細胞、アフリカミドリザル細胞、GH3細胞および本技術分野の熟練者に知られている他のこのような細胞〕、両生類細胞(たとえばアフリカツメガエル卵母細胞)、酵母細胞(たとえば, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*)等が包含される。注入されたRNA転写体を発現できる細胞の例には、アフリカツメガエル卵母細胞がある。DNAのトランスフェクションに好ましい細胞は本技術分野の熟練者に知られているかまたは経験的に同定が可能であり、HEK 293 (ATCC受入番号# CRL 1573から入手可能)、Ltk細胞(ATCC受入番号# CCL 1.3から入手可能)、COS-7細胞(ATCC受入番号# CRL 1651から入手可能)、GH3ラット脳下垂体腫瘍細胞(ATCC受入番号# CCL 82.1から入手可能)およびDG44細胞[dhfr<sup>-</sup> CHO細胞, たとえばUr1aubら(1986) Cell.Molec.Genet. 12:555参照]が包含される。現時点で好ましい細胞は、DG44細胞、GU3およびHEK293細胞であり、懸濁液中での増殖に適合され、液体窒素中で凍結し、ついで解凍し、再増殖できるHEK細胞、がとくに好ましい。HEK 293細胞は、

たとえば、Gormanの米国特許第5,024,939号に記載されている〔また、Stillmanら(1985) Mol.Cell.Biol.5:2051-2060参照〕。現時点で好ましい細胞にはまた、内因性または異種電位依存性カルシウムチャンネルを発現できる細胞が含まれる。

核酸は、本技術分野で既知の方法を用いて、細胞に安定にまたは一過性に導入することができる。安定にトランスフォームされた哺乳類細胞は、細胞を選択可能なマーカー遺伝子(たとえば、チミジンキナーゼ、ジヒドロ葉酸リダクターゼ、ネオマイシン抵抗性等の遺伝子)を含有するベクターで細胞をトランスフェクトし、トランスフェクトされた細胞を、マーカー遺伝子を発現する細胞が選択される条件下に増殖させて調製できる。このような細胞を製造するには、細胞を、異種DNAによってコードされたヒトサブユニットを含有するヒト神経細胞性ニコチン性AChRを形成するのに十分な濃度のサブユニットをコードする核酸でトランスフェクトする必要がある。サブユニットをコードするDNAの正確な量および割合は経験的に決定され、特定のサブユニットの組合せ、細胞およびアッセイ条件について至適化される。異種DNAまたはRNAによってコードされるサブユニットのみを含有する神経細胞性ニコチン性AChRを発現する組換え細胞がとくに好ましい

異種DNAは細胞内にエピソーム要素として保持されてもよく、また細胞の染色体DNA中に挿入されていてもよい。得られた組換え細胞はついで、その培養または副次培養体から培養または副次培養(哺乳類細胞の場合は継代培養)される。組換え細胞のトランスフェクション、注入および培養の方法は本技術分野の熟練者にはよく知られている。同様に、ヒト神経細胞性ニコチン性AChRサブユニットは、本技術分野の熟練者によって知られているタンパク質精製法を用いて精製することができる。たとえば1種または2種以上のサブユニットに特異的に結合する抗体または他のリガンドを、サブユニットまたはサブユニットを含むヒト神経細胞性ニコチン性AChRのアフィニティー精製に使用できる。

本発明のさらに他の実施態様によれば、上述のサブユニットタンパク質に対して精製された抗体が提供される。このような抗体は、受容体の組織分布、サブユニット組成物、機能性ドメインの構造、ならびに診断的応用および治療的応用の

研究に使用することができる。治療的応用には、抗体はモノクローナル抗体であることが好ましい。

上述の抗体は、本技術分野の熟練者にはよく知られた標準技術により、本発明のサブユニットまたはその部分を抗体産生のための抗原として用いて調製することができる。抗ペプチドおよび抗融合タンパク質抗体の両者を使用できる〔たとえば、Bahouthら(1991) Trends Pharmacol. Sci. vol. 12:338-343; Current Protocols in Molecular Biology (Ausubelら編), John Wiley and Sons, New York (1989)〕。免疫原として(合成ペプチドまたは組換えによって製造された細菌性融合タンパク質としての)NACHRサブユニットの部分の選択に際して考慮すべき因子には、抗原性、接近可能性(すなわち、細胞外および細胞内ドメイン)、特定のサブユニットに対する一意性等である。

サブユニットに特異的な抗体が利用できれば、各種サブユニットの(たとえば正常および疾患脳組織中の)分布および発現密度をモニターするために、免疫組織化学的な技術の適用が可能になる。このような抗体はまた診断的および治療的適用での利用が可能である。

本発明のさらに他の実施態様によれば、本発明の受容体に上述の抗体の有効量を接触させることによる、その受容体のイオンチャンネル活性を調節する方法が提供される。

本発明の抗体は、標準方法を用い、たとえば腹腔内、筋肉内、静脈内もしくは皮下に注射し、また移植もしくは経皮投与様式等により、患者に投与することができる。本技術分野の熟練者であれば、採用した投与様式に応じて、用量形態、処置基準等を容易に決定できる。

本発明の一実施態様によれば、また、ヒト神経細胞性ニコチン性AChRサブユニットおよび機能性受容体を発現する細胞を製造する方法が提供される。一方法においては、宿主細胞は、神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体の少なくとも1種の $\alpha$ サブユニットおよび神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体の少なくとも1種の $\beta$ サブユニットをコードするDNAによってトランスフェクトされる。ノーザンブロットまたはスロットブロット解析のような方法を用いて、 $\alpha$ お

よび／または $\beta$ サブユニットをコードするDNAまたはRNAを含むトランスフェク

トされた細胞を選択できる。トランスフェクトされた細胞はまた、NACHRタンパク質を発現する細胞を確認するために解析される。解析はたとえば、細胞がアセチルコリン、ニコチン、またはニコチンアゴニストに結合する能力を、非トランスフェクト宿主細胞または他の適当な対照細胞のニコチン結合能力と比較しながら、ニコチンアゴニストに応答して細胞膜を通過する電流を電気生理学的にモニターすること等で測定して実施される。

とくに好ましい態様においては、異種DNAを含有する真核細胞がこのDNAを発現し、組換えの機能性神経細胞性ニコチン性AChRを形成する。さらに好ましい態様においては、組換えの機能性神経細胞性ニコチン性AChR活性は、それが非トランスフェクト宿主細胞にはないタイプであるか、または非トランスフェクト細胞では認められない大きさであることから、容易に検出できる。組換え受容体を含有するこのような細胞は、たとえばヒト神経細胞性ニコチン性AChR $\alpha_3$ および $\beta_4$ サブユニットをコードするDNAで細胞をトランスフォームして、相当するタンパク質を発現するように調製できる。得られた合成または組換え受容体は $\alpha_3$ および $\beta_4$  nNACHRサブユニットのみを含有することになる。このような受容体は様々な適用、たとえば非ヒト受容体またはヒト組織プレパレーションを用いた従来技術のアッセイシステム中に存在することが多い妨害を含まないアッセイシステムの材料として有用である。さらに、単一の受容体サブユニットを様々な潜在的アゴニストまたはアンタゴニストで試験することによって、個々のサブユニットの機能および活性に関して付加的な情報を得ることができよう。このような情報は、1種または2種以上の受容体サブユニットと極めて特異的に相互作用できる化合物の同定を導くことが期待される。このような特異性は医学的に大きな価値があるものと思われる。

他の態様においては、本発明は、本発明のDNAによってコードされる機能性ペプチドフラグメントおよび機能性のそれらの複合体からなる。このような機能性ペプチドフラグメントは本技術分野の熟練者によれば、繁雑な実験をすることなく、NACHRとして機能するためにそのペプチドに必須ではない配列中のアミノ酸

の一部またはすべてを除去することによって製造できる。NACHR機能に必須なアミノ酸の決定はたとえば、そのペプチドをコードするDNAの系統的な消化および

／またはそのDNAへの欠失の導入によって行われる。修飾された（たとえば、欠失させたまたは消化した）DNAをたとえば、そのDNAの転写、ついで得られたmRNAをmRNAの翻訳が起こるアフリカツメガエル卵母細胞に導入することによって発現させる。このようにして卵母細胞中で発現したタンパク質の機能の解析は、その卵母細胞を、NACHRに結合してそれを機能的に活性化することが知られているリガンドに暴露し、ついで卵母細胞をモニターして内因性チャンネルが続いて活性化されるかどうかを調べることによって達成される。電流が検出されれば、そのフラグメントはNACHRとして機能性である。

すなわち、1種または2種以上のヒト神経細胞性ニコチン性AChRサブユニットをコードするDNAを、個々のサブユニットおよび機能性NACHRの発現のため、適当な宿主細胞（たとえば真核細胞または原核細胞）に導入することができる。 $\alpha$ および $\beta$ サブユニットの好ましい組合せを細胞中に導入できる。このような組合せには、 $\alpha_1$ 、 $\alpha_2$ 、 $\alpha_3$ 、 $\alpha_4$ 、 $\alpha_5$ および $\alpha_7$ の任意の1種または2種以上と $\beta_2$ または $\beta_4$ との組合せが包含される。 $\alpha_1$ についての配列情報はBiochem.Soc.Trans.(1989)17;219-220に、 $\alpha_5$ についての配列情報はProc.Natl.Acad.Sci.USA(1992)89:1572-1576に、 $\alpha_2$ 、 $\alpha_3$ 、 $\alpha_4$ 、 $\alpha_7$ 、 $\beta_2$ および $\beta_4$ の配列情報は本明細書の配列表に提供されている。現時点で好ましいサブユニットの組合せには、 $\alpha_1$ 、 $\alpha_2$ 、 $\alpha_3$ または $\alpha_4$ の1種または2種以上と $\beta_4$ 、または $\alpha_2$ 、 $\alpha_3$ または $\alpha_4$ と $\beta_2$ または $\beta_4$ のいずれかとの組合せが包含される。一部のサブユニットはさらに付加的なサブユニットがなくてもイオン輸送機能を発揮できる。たとえば $\alpha_7$ サブユニットは $\beta$ サブユニットが添加されなくても機能できる。

本明細書で用いられる「 $\alpha_2$ サブユニットDNA」の語は、同じ名称のヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体サブユニットをコードするDNAを意味し、高い緊縮条件下に配列番号：1のDNAに、またはATCC受入番号68277号として寄託されたクローンのDNAに、または配列番号：2に掲げたアミノ酸配列をコ

ードするDNAにハイブリダイズするDNAである。通常、 $\alpha_2$ サブユニットがスプライス変異体として生じるのでなければ、 $\alpha_2$ DNAは本明細書に記載した $\alpha_2$ DNAと実質的な（すなわち約90%を越える）配列ホモロジーを有する。スプライス変

異体をコードするDNAまたはRNAは本明細書に記載されたDNAまたはRNAと全体的配列に90%未満のホモロジーをもてばよいが、このようなスプライス変異体は上述のDNAとほぼ100%のホモロジーの領域を含むものである。

本明細書で用いられる「 $\alpha_3$ サブユニットDNA」の語は、同じ名称の神経細胞性サブユニットをコードするDNAを意味し、高い緊縮条件下に配列番号：3のDNAに、またはATCC受入番号68278号として寄託されたクローンのDNAに、または配列番号：4に掲げたアミノ酸配列をコードするDNAにハイブリダイズするDNAである。通常、 $\alpha_3$ サブユニットがスプライス変異体として生じるのでなければ、 $\alpha_3$ DNAは本明細書に記載した $\alpha_3$ DNAと実質的な（すなわち約90%を越える）配列ホモロジーを有する。スプライス変異体をコードするDNAまたはRNAは本明細書に記載されたDNAまたはRNAと全体的配列に90%未満のホモロジーをもてばよいが、このようなスプライス変異体は上述のDNAとほぼ100%のホモロジーの領域を含むものである。

本明細書で用いられる「 $\alpha_5$ サブユニットDNA」の語はたとえばChibaら（1992）Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89：1572-1576に記載されたように、同じ名称のヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体サブユニットをコードするDNAを意味する。

本明細書で用いられる「 $\beta_2$ サブユニットDNA」の語は、同じ名称の神経細胞性サブユニットをコードするDNAを意味し、高い緊縮条件下に配列番号：9のDNAに、またはATCC受入番号68279号として寄託されたクローンHnAChR $\beta_2$ のDNAに、または配列番号：10に掲げたアミノ酸配列をコードするDNAにハイブリダイズするDNAである。通常、 $\beta_2$ サブユニットがスプライス変異体として生じるのでなければ、 $\beta_2$ DNAは本明細書に記載した $\beta_2$ DNAと実質的な（すなわち約90%を越える）配列ホモロジーを有する。スプライス変異体をコードするDNAまたはRNAは本明細書に記載されたDNAまたはRNAと全体的配列に90%未満のホモロジー

をもてばよいが、このようなスプライス変異体は上述のDNAとほぼ100%のホモロジーの領域を含むものである。

ある実施態様においては、異種ヒト神経細胞性ニコチン性AChRをもつ真核細胞が、細胞中でヒト神経細胞性ニコチン性AChRのサブユニットに翻訳される少なく

とも1種のRNA転写体を含有する第一の組成物を細胞に導入することによって製造される。好ましい実施態様においては、翻訳されるサブユニットはヒト神経細胞性ニコチン性AChRの $\alpha$ サブユニットを包含する。さらに好ましくは、導入される組成物は $\alpha$ サブユニットをコードするRNA転写体を含有し、さらにヒト神経細胞性ニコチン性AChRの $\beta$ サブユニットをコードするRNA転写体を含有する。RNA転写体はヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体サブユニットをコードするDNAでトランスフェクトされた細胞から、またはサブユニットをコードするDNAのインビトロ転写によって得ることができる。クローン化されたDNAのインビトロ転写および得られたmRNAの真核細胞への導入の方法は本技術分野においてよく知られている。本発明によって提供されるヒトnAChR DNAのインビトロ転写体の発現には、両生類の卵母細胞がとくに好ましい。イオンチャンネルの研究のためのアフリカツメガエル卵母細胞の使用についての総説としてはたとえば、Dasca[ (1989) CRC Crit.Rev.Biochem. 22:317-387]が参考になる。

すなわち、 $\alpha$ および $\beta$ サブユニットをコードするDNAまたはRNAの細胞への対ごとの（または段階的）導入が可能である。得られた細胞は、本明細書に提供された方法、または機能性AChR活性の検出する本技術分野の熟練者に知られた方法によって試験できる。このような試験は機能性AChRを生じる $\alpha$ および $\beta$ サブユニット対ならびに機能性AChRを生じる個々のサブユニットの同定を可能にする。

本明細書で用いられる「組換えまたは異種ヒト神経細胞性ニコチン性AChR」の語は、受容体タンパク質を発現できる細胞中に導入され、発現された異種DNAによってコードされる1種または2種以上のサブユニットを含有する受容体を意味する。組換えヒト神経細胞性ニコチン性AChRはまた、宿主細胞に内因性のDNAによって産生されるサブユニットを包含してもよい。ある実施態様においては、ヒト神経細胞性ニコチン性AChRは、異種DNAによってコードされるサブユニットの

みを含む。

組換え真核細胞上の組換え受容体は、ヒト神経細胞性ニコチン性AChRサブユニットをコードするDNAまたはmRNAによってコードされる1種または2種以上のサブユニットを含むとしてもよく、また宿主細胞によってコードされるサブユニットおよび異種DNAまたはmRNAによってコードされるサブユニットの混合物を含むし

ていてもよい。組換え受容体は均一であってもまたサブタイプの混合物であってもよい。多様な種たとえばラットおよびヒトからの受容体をコードするDNAまたはmRNAの混合物を細胞中に導入することもできる。すなわち、 $\alpha_3$ および $\beta_4$ サブユニットのみを含む組換え受容体または本明細書に与えられた $\alpha$ および $\beta$ サブユニットの任意の他の組合せを発現する細胞を調製することができる。たとえば、本発明の $\alpha_4$ および/または $\alpha_7$ サブユニットは、 $\beta_2$ および/または $\beta_4$ 受容体サブユニットと共発現させることができる。同様に、本発明の $\beta_4$ サブユニットは、 $\alpha_2$ 、 $\alpha_3$ 、 $\alpha_4$ 、 $\alpha_5$ および/または $\alpha_7$ 受容体サブユニットと共発現させることができる。前に述べたように、nAChRサブユニットの一部は他のサブユニットがなくても機能性の受容体を形成できるので、機能性受容体の製造には常に共発現が必要なわけではない。

本明細書で用いられるヒト神経細胞性ニコチン性AChRの活性とは、NACHRに特徴的な任意の活性を意味する。このような活性は通常、1種または2種以上のインビトロ方法によって測定することが可能で、それは多くの場合、ヒト神経細胞性ニコチン性AChRのインビボ活性に相当する。このような活性は本技術分野の熟練者に知られた任意の方法によって、たとえば刺激に応答して組換えチャンネルを流れる電流の量を測定することによって、測定できる。

ヒト神経細胞性ニコチン性AChRの存在の決定および/または活性の測定方法には、ニコチンの結合、 $^{86}\text{Rb}$ イオンの流量、 $\text{Ca}^{2+}$ の流入、細胞の電気生理学的応答、細胞からのRNAでトランスフェクトされた卵母細胞の電気生理学的応答等を測定するアッセイが包含される。とくに、本発明では、AChRのDNAまたはmRNAを含む細胞を試験化合物と接触させた場合にAChRが仲介する応答を測定または検出する方法が提供される。



本明細書において用いられる機能性の神経細胞性ニコチン性AChRとは、本明細書に開示されたまたは本技術分野の熟練者に知られているインビトロまたはインビボアッセイによって評価して神経細胞性ニコチン性AChRを示す受容体である。本技術分野の熟練者に知られている方法および本発明によって提供された方法によって評価できるこのような活性をもてば、受容体を機能性と呼ぶのに十分である。NACHRタンパク質および／または活性の検出方法には、たとえばニコチンの

結合、 $^{86}\text{Rb}$ イオンの流量、 $\text{Ca}^{2+}$ の流入、1種もしくは2種以上の受容体サブユニットをコードする異種DNAまたはmRNAを含有する細胞の電気生理学的応答等を測定するアッセイが包含される。 $\alpha$ および $\beta$ サブユニットのすべての組合せが機能性受容体を形成するわけではないので、特定のサブユニットおよびそれを産生する細胞の特性を完全に明らかにするためには、 $\alpha$ および $\beta$ サブユニットの多くの組合せについて試験する必要がある。すなわち、組換えまたは異種ヒト神経細胞性ニコチン性AChRに関して本明細書で用いられる「機能性」の語は、受容体チャネルが、刺激および／または受容体に親和性を有するリガンドの結合に応答してヒト神経細胞性ニコチン性AChR透過性イオン、たとえば $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、または $\text{Ba}^{2+}$ を提供し、その流入を調節できることを意味する。このような活性は、宿主細胞によって産生される内因性のニコチン性AChR活性とは、たとえば電気生理学的に、薬理的におよび本技術分野の熟練者に知られた他の手段によって識別できるものであることが好ましい。

本発明の特定の実施態様によれば、組換えヒト神経細胞性ニコチン性AChR発現哺乳類細胞または卵母細胞は試験化合物と接触させ、その調節作用をついで、試験化合物の存在下および不存在下におけるAChR仲介の応答を比較することによりまたは化合物の存在下に対する試験細胞または対照細胞（すなわち、nAChRを発現しない細胞）のAChR仲介の応答を比較することにより評価することができる。

本明細書において用いられる「神経細胞性ニコチン性AChRの活性を調節する」化合物またはシグナルとは、その化合物またはシグナルの存在下とその化合物またはシグナルの不存在下でNACHRの活性が異なるようにNACHRの活性を変化させる化合物またはシグナルを意味する。とくに、このような化合物またはシグナルに

はアゴニストおよびアンタゴニストが包含される。アゴニストの語は、AChのように受容体機能を活性化する物質またはシグナルを意味し、アンタゴニストの語は受容体機能を妨害する物質を意味する。通常、アンタゴニストの作用はアゴニストによる活性化の遮断として観察される。アンタゴニストには競合的アンタゴニストと非競合的アンタゴニストがある。競合的アンタゴニスト（または競合的遮断剤）は同一のまたは近接して位置する部位に対するアゴニスト（たとえばリガンドまたは神経伝達物質）の特異的な部位またはその付近と相互作用する。

非競合的アンタゴニストまたは遮断剤はアゴニストと相互作用する部位以外の部位と相互が用して受容体の機能性を不活性化する。

本技術分野の熟練者には明らかなように、ヒト神経細胞性ニコチン性AChR活性を調節する化合物（たとえばアゴニストおよびアンタゴニスト）を同定するためのアッセイ方法では、一般的に対照との比較が必要である。「対照」細胞または「対照」培養液の一つのタイプは、試験化合物に暴露される細胞または培養液と実質的に同様に処理されるが対照培養液は試験化合物には暴露されない細胞または培養液である。たとえば、電圧固定電気生理学的操作を使用する方法では、細胞浴の外液を単に交換するだけで同一の細胞を試験化合物の存在下および不存在下に試験することができる。他のタイプの「対照」細胞または「対照」培養液はトランスフェクトされた細胞と同一の細胞または細胞培養液であるが、対照培養液に用いられる細胞は機能性のヒト神経細胞性ニコチン性AChRを発現しない。この場合には、試験化合物に対する試験細胞の応答は、細胞または各タイプの細胞の培養液を検定される化合物の存在下に実質的に同一の反応条件に暴露した場合の試験化合物に対する受容体陰性（対照）細胞の応答（または応答の欠如）と比較される。

機能性の組換えヒト神経細胞性ニコチン性AChRは、ヒト神経細胞性ニコチン性AChRの少なくとも1種の $\alpha$ サブユニットまたは1種の $\alpha$ サブユニットと1種の $\beta$ サブユニットを包含する。これらのサブユニットを発現する真核細胞はRNA転写体の注入およびDNAのトランスフェクションによって調製されてきた。このような細胞は、1種または2種以上の異種ヒト神経細胞性ニコチン性AChRサブユニッ

トを含有するヒト神経細胞性ニコチン性AChRに起因する、ニコチン性AChR活性を発揮した。たとえば、ヒト神経細胞性ニコチン性AChR $\alpha_3$ および $\beta_4$ サブユニットをコードするDNAのインビトロ転写体を注入したアフリカツメガエル卵母細胞は、AChRアゴニスト誘導電流を示すのに対し、 $\alpha_3$ または $\beta_4$ サブユニットいずれかの転写体単独を注入した細胞では誘導電流は認められなかった。さらに、ヒト神経細胞性AChR $\alpha_3$ および $\beta_4$ サブユニットをコードするDNAでコトランスフェクトしたHEK293細胞はAChRアゴニストによって誘導される細胞内カルシウム濃度の上昇を示すのに対し、対照HEK293細胞（すなわち、 $\alpha_3$ および $\beta_4$

をコードするDNAでトランスフェクトしなかった細胞）ではAChRアゴニストによって誘導される細胞内カルシウム濃度の上昇は認められなかった。

機能性の異種ヒト神経細胞性ニコチン性AChRの活性の測定に関しては、内因性AChR活性および、所望により、内因性宿主細胞サブユニットおよび異種サブユニットの混合物を含有するAChRの活性は、可能であれば、化学的、薬理的および電気生理学的手段によって有意な程度まで阻害すべきである。

#### 寄託

寄託されたクローンは、特許手続きのための微生物の寄託の国際的承認に関するブタペスト条約およびこの条約に基づいて公布された規定の条件でAmerican Type Culture Collection (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, U.S.A. 20852に寄託された。寄託された材料のサンプルは、上記条約および規定によりそれらを受取る法的資格を有する工業所有権局および他の個人、あるいはアメリカ合衆国、ならびにこの出願もしくはこの出願の優先権を主張した出願が提出されるかまたはこのような出願に関して付与された特許を承認する他のすべての国もしくは国際機構の法律または規定によって入手可能でありまたは入手可能となる。とくに、この出願またはこの出願の優先権を主張した出願もしくはこの出願がその引例として導入された出願に基づく米国特許の発行により、寄託された材料の利用に関するすべての制限は最終的に排除される。

#### 例1

##### ヒトnNACHRサブユニットをコードするDNAの単離

#### A. ヒト nAChR $\beta_4$ サブユニットをコードする DNA

IMR 32 ヒト神経芽細胞腫細胞系（細胞はライブラリーの構築前に10日間1 mMのジブチルCAMP中で生育させた）から単離されたRNAからのcDNAの合成にはランダムプライマーを使用した。cDNAから構築されたライブラリーをラットニコチン性AChR  $\beta_4$  サブユニットcDNAのフラグメントでスクリーニングした。ハイブリダイゼーションは、5×SSPE、5×デンハルト溶液、50%ホルムアミド、200  $\mu$ g/mlのニシン精子DNAおよび0.2% SDS中42℃で実施した。洗浄は0.1×SSPE、0.2% SDS中65℃で行った。プローブにハイブリダイズした5つのクローンを同定した。

5つのクローンはブランク精製し、制限酵素地図作成およびDNA配列解析によって性質を調べた。5つのクローン中の一つの挿入DNAがヒトニコチン性AChRの  $\beta_4$  サブユニットの完全コード配列を含有していた（配列番号：11のヌクレオチド87-1583参照）。完全長クローンのヌクレオチド配列から推定されたアミノ酸配列は、ラットニコチン性AChR  $\beta_4$  サブユニットDNAから推定されたアミノ酸配列と約82%の同一性を示す。推定されたラットおよびヒト  $\beta_4$  アミノ酸配列はいくつかの領域で著しく相違している。すなわち、アミノ酸1-23（ヒト配列はラット配列に対してわずかに約36%の同一性を示す）、352-416（ヒト配列はラット配列に対してわずかに約48%の同一性を示す）および417-492（ヒト配列はラット配列に対してわずかに約78%の同一性を示す）である。さらに、ラット  $\beta_4$  サブユニット中のアミノ酸376-379はヒト  $\beta_4$  サブユニットには含まれていない。

#### B. ヒト nAChR $\alpha_7$ サブユニットをコードする DNA

増幅したIMR 32細胞のcDNAライブラリー（ $1 \times 10^6$ 組換え体；細胞はライブラリーの構築前に10日間1 mMのジブチルCAMP中で処置）をラットニコチン性AChR  $\alpha_7$  サブユニットcDNAのフラグメントでスクリーニングした。ハイブリダイゼーション条件は、IMR 32細胞cDNAライブラリーのラット  $\beta_4$  サブユニットDNAによるスクリーニングについて上述した条件と同じであった。洗浄は0.2×SSPE、0.2% SDS中65℃で行った。標識ラットDNAプローブへのハイブリダイゼ

ーションにより7個の陽性クローンが同定された。その6個のクローンをブランク精製し、制限酵素地図作成およびDNA配列解析により性質を調べた。1つのクローンがヒトAChR受容体の $\alpha_7$ サブユニット遺伝子の完全コード配列を含有していた(配列番号:7のヌクレオチド73-1581参照)。

#### C. ヒトnNACHR $\alpha_4$ サブユニットをコードするDNA

ヒト海馬組織から単離されたRNAからのcDNAの合成にはランダムプライマーを使用した。2.0 kbより大きいcDNAを $\lambda$ gt10ファージベクターに挿入してcDNAライブラリーを創製した。約 $1 \times 10^6$ 組換え体をラットニコチン性AChR $\alpha_4$ サブユニットをコードするDNAのフラグメントでスクリーニングした。ハイブリダイゼーションおよび洗浄条件には、 $\alpha_7$ サブユニットcDNAについてのIMR 32細

胞cDNAライブラリーのスクリーニングに関して上述したのと同じ条件を使用した。3つのクローンがプローブに強力にハイブリダイズした。これらの3つのクローン中の2つをKE $\alpha_4$ .1およびKE $\alpha_4$ .2と命名し、American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) に寄託し、それぞれ受入番号69152号および69239号が割り当てられた。

ブランク精製されたクローンの性質を調べたところ、KE $\alpha_4$ .2がヒトニコチン性AChR $\alpha_4$ サブユニット遺伝子の完全なコード配列を含有していた(このヒト $\alpha_4$ サブユニットcDNAのコード配列は配列番号:5のヌクレオチド173-2056として与えられる)。ヒトおよびラット $\alpha_4$ サブユニットcDNAのコード配列の5'末端の比較から、とくに顕著な差異は、ラット配列はヒト配列には存在しない18ヌクレオチドのセグメントを含有することであることがわかる。

#### D. ヒトnNACHR $\alpha_2$ , $\alpha_3$ および $\beta_2$ サブユニットをコードするDNA

ヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体 $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ および $\beta_2$ サブユニットをコードするDNA, および/またはそれらをコードする核酸を単離するために使用できるDNA, を含有するプラスミドはAmerican Type Culture Collection (ATCC) に寄託された。クローンの名称および寄託受入番号は次の通りである。

サブユニット	クローンの名称	ATCC受入番号
$\alpha_2$	HnAChR $\alpha_2$	68277
$\alpha_3$	HnAChR $\alpha_3$	68278
$\beta_2$	HnAChR $\beta_2$	68279

さらに、 $\alpha_2$ 、 $\alpha_3$ および $\beta_2$ サブユニットの全長をコードするDNA配列はそれぞれ、配列番号：1、3および9に掲げる。

## 例 2

### 組換えヒト神経細胞性ニコチン性AChRサブユニットの 発現のための構築体の製造

ヒト神経細胞性ニコチン性AChRサブユニットをコードする単離されたcDNAを、哺乳類宿主細胞中でそのサブユニットを発現に使用するためおよびアフリカツメ

ガエル卵母細胞中で発現させるためインビトロ転写体の生成に使用するため、ベクター中に導入した。構築体の調製には数種の異なるベクターを以下のように利用した。

#### A. ヒトnNACHR $\alpha_3$ サブユニットの発現のための構築体

ヒト神経細胞性ニコチン性AChR $\alpha_3$ サブユニットをpCMV-T7-2一般発現ベクター中にサブクロニングしてpCMV-KE $\alpha_3$ を創製した。プラスミドpCMV-T7-2（図1参照）はCMVプロモーター／エンハンサー、プロモーターの直ぐ下流に位置するSV40スプライスドナー／スプライスアクセプター部位、SV40スプライス部位の下流に位置するT7バクテリオファージRNAポリメラーゼプロモーター、T7プロモーターの下流のSV40ポリアデニル化シグナル、およびT7プロモーターとポリアデニル化シグナルの間のポリリンカーを含有するpUC 19ベースのベクターである。すなわち、このベクターは哺乳類宿主細胞中での異種DNAの発現に必要なすべての調節要素を含有し、異種DNAはこのベクター中のポリリンカーに挿入された。T7プロモーターはポリリンカーの直ぐ上流に位置するので、さらに、このプラスミドはこのベクター中ポリリンカーにサブクロニングされた異種DNAからインビトロ転写体の合成にも使用できる。図1にはまたpCMV-T7-3の制限酵素地図を示す。このプラスミドは、ポリリンカー中の制

限部位がpCMV-T7-2における順序と比較して逆の順序であるほかはpCMV-T7-2と同一である。

配列番号：3のヌクレオチド27-1757を含有する1.7kb SfiI (ブラント末端) /EcoRI DNAフラグメント (すなわち全 $\alpha_3$ サブユニットコード配列+5' 非翻訳配列の12ヌクレオチドおよび3' 非翻訳配列の204ヌクレオチド) をEcoRV/EcoRI消化pCMV-T7-2にライゲートしてpCMV-K $\alpha_3$ を生成させた。プラスミドpCMV-K $\alpha_3$ は哺乳類細胞中における $\alpha_3$ サブユニットの発現および $\alpha_3$ サブユニットDNAからインビトロ転写体の生成に使用した。

#### B. ヒトnNACHR $\beta_4$ サブユニットの発現のための構築体

配列番号：11のヌクレオチド1-1915を含有する1.9kb EcoRI DNAフラグメント (すなわち、全 $\beta_4$ サブユニットコード配列+5' 非翻訳配列の86ヌクレオチドおよび3' 非翻訳配列の332ヌクレオチド) をEcoRI消化pGEM7 Zf (+)

(Promega, カタログ# P2251; Madison, WI) にライゲートした。得られた構築体, KE $\beta_4$ . 6 /pGEMは、2つの縦列 $\beta_4$ サブユニットDNA挿入体 (同一方向性) と操作性に連結したT7バクテリオファージRNAポリメラーゼプロモーターを含有し、DNAからインビトロ転写体の生成に使用した。

同じ配列番号：11のヌクレオチド1-1915を含有する1.9kb EcoRI DNAフラグメントを単一の挿入体としてEcoRI消化pCMV-T7-3に挿入し、pCMV-K $\beta_4$ を生成させた。プラスミドpCMV-K $\beta_4$ は哺乳類細胞中における $\beta_4$ サブユニットの発現および $\beta_4$ サブユニットDNAのインビトロ転写体の生成に使用した。

#### C. ヒトnNACHR $\alpha_7$ サブユニットの発現のための構築体

ヒト神経細胞性ニコチン性AChR $\alpha_7$ サブユニットの組換え発現に使用するために、2種のpCMV-T7-ベースの構築体を調製した。第一の構築体, pCMV-KE $\alpha_7$ . 3は配列番号：7のヌクレオチド1-1876を含有する1.9kb XhoI DNAフラグメント (すなわち、全 $\alpha_7$ サブユニットコード配列+5' 非翻訳配列の72ヌクレオチドおよび3' 非翻訳配列の295ヌクレオチド) をSalI消化pCMV-

T7-3にライゲートして調製した。第二の構築体、pCMV-KE $\alpha$ 7は、上述の1.9 kb XhoI $\alpha$ 7サブユニットDNAフラグメントの5' 非翻訳配列をコンセンサスリボソーム結合部位〔5' -GCCACC-3' , Kozak (1987) Nuc1.Acids Res. 15:8125-8148〕で置換することによって調製した。得られた修飾フラグメントを1.8 kb BglIII/XhoIフラグメントとしてBglIII/SalI-消化pCMV-T7-2にライゲートして、pCMV-KE $\alpha$ 7を創製した。このようにしてpCMV-KE $\alpha$ 7には、 $\alpha$ 7サブユニットcDNAのコード配列の翻訳開始コドンの直前にコンセンサスリボソーム結合部位が配置される。

#### D. ヒト nNACHR $\beta$ 2サブユニットの発現のための構築体

ヒト神経細胞性ニコチン性AChR $\beta$ 2サブユニットの部分をコードするDNAフラグメントを互いにライゲートして、プラスミドpIBI24 (International Biotechnologies, Inc., (IBI), New Haven, CT) 中に、完全長 $\beta$ 2サブユニットコード配列を生成させた。得られた構築体、H $\beta$ 2.1Fは配列番号:9のヌクレオチド1-2448 (すなわち、全 $\beta$ 2サブユニットコード配列+5' 非翻訳

配列の264ヌクレオチドおよび3' 非翻訳配列の675ヌクレオチド)をT7プロモーターと操作性に連結して含有する。 $\beta$ 2サブユニットDNAの5' 非翻訳配列は正しい翻訳開始コドン(配列番号:9のヌクレオチド265-267)の11ヌクレオチド上流に始まる潜在的な別の翻訳開始コドン(ATG,配列番号:9のヌクレオチド254-256)を含有すること、および $\beta$ 2DNAの翻訳を開始する上流のATG配列の使用が無効のペプチドの生成を生じる可能性があることから(上流のATGは正しいリーディングフレーム内にはないので)、さらに $\beta$ 2をコードする構築体を次のように調製した。配列番号:9のヌクレオチド206-2448を含有する2.2 kb KpsI(プラント末端)/EcoRI DNAフラグメントを、NotI(プラント末端)/EcoRI消化pCMV-T7-3にライゲートして、プラスミドのT7プロモーターに操作性に連結し、pCMV-KE $\beta$ 2を生成させた。pCMV-KE $\beta$ 2に含有される $\beta$ 2サブユニットDNAは正しい翻訳開始コドンの上流の5' 非翻訳配列の5ヌクレオチドを残すのみである。

ヒトNACHR $\beta$ 2サブユニットをコードするDNAはまた、発現ベクターpSP64T



中にも導入した。ベクターpSP 64 T [Krieg & Melton (1984), *Nucl. Acids Res.* 12:7057-7070] はベクターpSP 64 (Promega) の改良型である。ヒトNACHR $\beta_2$ サブユニットをコードする配列(コンセンサスリボソーム結合部位が先行する) + 3' 非翻訳領域の405ヌクレオチドはアフリカツメガエル $\beta$ グロビン遺伝子からの5' および3' 非翻訳配列に隣接する唯一の制限酵素クローニング部位でpSP 64 T中に導入された。これらの配列はpSP 64 T中に含まれるSP6プロモーターの下流に配置される。得られたベクター, pSP 64 T-KE $\beta_2$  RBSIは, MEGAscript SP 6キット (Ambion, カタログ番号1330) を用いて異種DNAのインビトロ転写体の製造のために, SP6転写調節領域と操作性に連結したヒト $\beta_2$ サブユニットコード配列を含有する。

#### E. ヒトnNACHR $\alpha_4$ サブユニットの発現のための構築体

ヒトnNACHR $\alpha_4$ サブユニットをコードする配列を含むクローンKE $\alpha_4$ . 2の挿入体の部分(例1C参照)を以下のようにして, 修飾ベクターpIBI24に導入した。ベクターpIBI24はNotI部位の直ぐ上流のポリリンカー中にコンセンサスリボソーム結合部位を挿入して修飾した。ベクターはHindIIIおよびNcoIで消化し

た。ヒトnNACHR $\alpha_4$ サブユニットをコードする配列を含むNcoI-HindIIIフラグメントは, ヒトnNACHR $\alpha_4$ サブユニットcDNA含有プラスミドをHindIII (これはKE $\alpha_4$ . 2の3' 非翻訳配列に対して3' 側に隣接するポリリンカー中を切断する) で消化し(配列番号: 5参照), ついでNcoIで部分消化して(内部のNcoI部位, すなわち配列番号: 5の位置1956を維持するため)  $\alpha_4$ サブユニットコードcDNAの翻訳開始コドンと5' 非翻訳配列の接合部で切断して得られた。得られた3.25 kbフラグメントを, 修飾pIBI24ベクターのHindIII-NcoIフラグメントとライゲートして, pIBI-KE $\alpha_4$  RBSfを創製した。したがって, pIBI-KE $\alpha_4$  RBSfはコンセンサスリボソーム結合部位と, その直後にヒトnNACHR $\alpha_4$ サブユニットコード配列(配列番号: 5のヌクレオチド173-2056) および3' 非翻訳配列の約1400ヌクレオチド(配列番号: 5のヌクレオチド2057-2363)を含有する。この構築体は $\alpha_4$ サブユニットコード配列の上流にT7プロモーターを含有するので,  $\alpha_4$  DNAからインビトロ転写体の生成に使用できる。

## 例 3

組換えヒトニコチン性AChRの卵母細胞中での発現

$\alpha_3$ -,  $\alpha_7$ ,  $\beta_2$ および $\beta_4$ サブユニットをコードするDNAを含む構築体から調製したインビトロ転写体をアフリカツメガエル卵母細胞に注入した。二電極電圧固定法〔たとえば, Stuhmer (1992) Meth.Enzymol. 207:319-339 参照〕を用いて卵母細胞の膜電流を電気生理学的に測定した。

1. インビトロ転写体の調製

pCMV-KE $\alpha_3$ , pCMV-KE $\beta_2$ , KE $\beta_4$ . 6/pGBMおよびpCMV-KE $\beta_4$ の組み換えキャッピング転写体をmCAP RNAキャッピングキット (カタログ番号#200350, Stratagene, Inc., La Jolla, CA) を用いて線状化プラスミドから合成した。pCMV-KE $\alpha_7$ , pCMV-KE $\alpha_7$ . 3, pIBI-KE $\alpha_4$  RBSfおよびH $\beta_2$ . 1Fの組換えキャッピング転写体は、線状化プラスミドから、MEGAscript T7インビトロ転写キットを用い製造業者によって提供されたキャッピング転写プロトコル (カタログ番号#1334, AMBION, Inc., Austin, TX) に従って合成した。合成された各転写体の質量はUV吸収によって測定し、各転写体の統合性はアガロースゲル

を通した電気泳動によって測定した。

2. 電気生理学

アフリカツメガエル卵母細胞に、細胞あたりヒトニコチン性AChRサブユニット12.5, 50または125 ngを注入した。卵母細胞の調製および注入は, Dascal (1987) Crit.Rev.Biochem. 22:317-387の記載に従って実施した。mRNAの注入後2~6日に二電極電圧固定法を用いて卵母細胞を調べた。1  $\mu$  Mのアトロピンを含有するリンゲル液 (115 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, pH7.3) にd-ツボクラリン100  $\mu$  Mを加えたまたは加えない液に細胞を浸漬した。細胞を-60~-80 mVで電圧固定法に付した。データは2~5 HzでAxotapeソフトウェアにより取得した。アゴニストのアセチルコリン (ACh), ニコチン, およびシチシンは, 0.1  $\mu$  M~100  $\mu$  Mの範囲の濃度に添加した。卵母細胞の電気生理学的解析の結果は表1にまとめた。

表 1

温度, 注入RNA ng	応答卵母 細胞数	アゴニスト	電流振幅
pCMV-KE $\alpha$ 3, 12.5ng	0/8	ACh ニコチン	
KE $\beta$ 4.6/pGEM 12.5ng	0/9	ACh ニコチン	
pCMV-KE $\alpha$ 3, 12.5ng + KE $\beta$ 4.6/pGEM 12.5ng	4/5	ACh ニコチン	20-550nA
pCMV-KE $\alpha$ 3, 12.5ng + KE $\beta$ 4.6/pGEM 12.5ng	3/4	ACh シチシン ニコチン	20-300nA
pCMV-KE $\alpha$ 3, 125ng + pCMV-KE $\beta$ 4, 125ng	5/5	ACh ニコチン シチシン	200-500nA
pCMV-KE $\alpha$ 3, 125ng + pCMV-KE $\beta$ 4, 125ng	6/6	ACh ニコチン シチシン	100-400nA
pCMV-KE $\alpha$ 7.3, 125ng	3/15	ACh	約20nA
pCMV-KE $\alpha$ 7, 125ng	11/11	ACh	20-250nA
pCMV-KE $\alpha$ 3, 12.5ng + pCMV-KE $\beta$ 2 12.5ng	2/9	ACh ニコチン	<10nA
pCMV-KE $\alpha$ 3, 125ng + pVMV-KE $\beta$ 2 125ng	0/9	ACh ニコチン	
pCMV-KE $\alpha$ 3, 125ng + H $\beta$ 2.1F, 125ng	13/16	ACh(100 $\mu$ M) ACh(300 $\mu$ M)	約20nA 約80nA
pIBI-KE $\alpha$ 4RBSf, 125ng + pCMV-KE $\beta$ 4, 125ng	3/3	ACh(30 $\mu$ M)	約40nA

a.  $\alpha$  および/または  $\beta$  転写体を注入された卵母細胞

12.5 ngの $\alpha_3$ 転写体または12.5 ngの $\beta_4$ 転写体を注入された卵母細胞は、100  $\mu$ MまでのACh,ニコチンまたはシチシンの適用に応答しなかった。したがって、これらのサブユニットは機能性の同種因子ニコチン性AChRチャンネルは形成しないものと思われる。これに反し、12.5 ngまたは125 ngの $\alpha_3$ 転写体および12.5 ngまたは125 ngの $\beta_4$ 転写体を注入した卵母細胞は、試験濃度(0.1~10  $\mu$ M)のACh,ニコチンおよびシチシンに応答して検知可能な内向き電流を生じた。ニコチンおよびAChの応答に比較してシチシンの応答には速度論的にある程度の差が観察された。これらのアゴニストの相対強度はシチシン>ACh>ニコチンであり、ラットニコチン性AChR $\alpha_3$ および $\beta_4$ サブユニットの転写体を注入された卵母細胞についての類似の研究の結果と相違した〔たとえば、Luetjeら(1991)〕。Neurosci.11:837-845参照〕。

AChおよびニコチンに対する応答はd-ツボクラリンによって再現性よく遮断された。たとえば、AChに対する応答の完全な遮断は100  $\mu$ Mのd-ツボクラリンの存在下に観察された。阻害は可逆性であった。ACh,ニコチンおよびシチシンに対する応答はまた100  $\mu$ Mのメカミルアミンによって少なくとも部分的に遮断された。

$\alpha_3$ - $\beta_4$ -注入卵母細胞の10  $\mu$ M AChに対する電流応答も膜電位に換算して調べた。これらの実験では、AChの存在下、細胞に段階的に電圧を適用した。電流と電圧の関係のグラフにはNa<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-透過性チャンネルに認められる典型的な応答が出現した。たとえば、ゼロ電流レベル(反転電位)は-40 mV未満である。総電流に対するCa<sup>2+</sup>流量の寄与は、外液のカルシウム濃度を変化させて反転電位の周辺での様々な保持電位において頻回に電流を測定して確認することができる。このような研究では、 $\alpha_3$ - $\beta_4$ -注入卵母細胞のACh処理に応答して発生する電流を運ぶチャンネルはNa<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>およびCa<sup>2+</sup>透過性である。

表1に示すように、125 ngの $\alpha_4$ 転写体および125 ngの $\beta_4$ 転写体を注入された卵母細胞もアセチルコリンに応答して検知可能な内向き電流を生じた。

#### b. $\alpha_7$ サブユニットを注入された卵母細胞

例2に記載したようにして、ヒト神経細胞性ニコチン性AChR $\alpha_7$ サブユニット

の発現に使用するために2つの構築体を調製した。プラスミドpCMV-KE  $\alpha 7$ . 3は翻訳開始コドンの上流に、5' 非翻訳配列の72ヌクレオチドとともに $\alpha 7$ サブユニットコード配列を含有する。プラスミドpCMV-KE  $\alpha 7$ は5' 非翻訳配列を欠く $\alpha 7$ サブユニットコード配列を含有し、さらにコード配列の直ぐ上流にコンセンサスリボソーム結合部位を含む。

pCMV-KE  $\alpha 7$ から合成した $\alpha 7$ 転写体125 ngを注入した卵母細胞は、10～100  $\mu$ MのAChに応答して内向きの電流を生じた。この応答は100  $\mu$ Mのd-ツボクラリンによって遮断された。

pCMV-KE  $\alpha 7$ . 3から合成した $\alpha 7$ 転写体125 ngを注入された卵母細胞は、pCMV-KE  $\alpha 7$ から合成した $\alpha 7$ 転写体125 ngを注入した卵母細胞の場合よりも実質的に弱いACh-誘導電流を生じた。これらの結果は、5' 非翻訳配列の代わりに、リボソーム結合部位を含有する $\alpha 7$ サブユニットDNAから生成したヒト神経細胞性ニコチン性AChR  $\alpha 7$ サブユニット転写体の方が卵母細胞における $\alpha 7$ 受容体の発現には好ましいことを示している。

#### c. $\alpha 3$ および $\beta 2$ サブユニット転写体を注入された卵母細胞

例2に記載したようにして、ヒト神経細胞性ニコチン性AChR  $\beta 2$ サブユニットの発現に使用するために2つの構築体を調製した。プラスミドH  $\beta 2$ . 1 Fは翻訳開始コドンの上流に、5' 非翻訳配列の266ヌクレオチドとともに $\beta 2$ サブユニットコード配列を含有する。プラスミドpCMV-KE  $\beta 2$ は翻訳開始コドンの上流に、 $\beta 2$ サブユニットコード配列と5' 非翻訳配列のわずか5ヌクレオチドを含有する。

pCMV-KE  $\alpha 3$ およびpCMV-KE  $\beta 2$ の転写体を注入した卵母細胞は、ニコチン性AChRアゴニストに応答して実質的に電流は生じなかった。これに反して、pCMV-KE  $\alpha 3$ とpCMV-KE  $\beta 2$ の転写体を注入した卵母細胞は、100  $\mu$ MのAChに応答して約20 nAの内向き電流を、300  $\mu$ MのAChに応答して約80 nAの内向き電流を生じた。電流応答は100  $\mu$ Mのd-ツボクラリンによって遮断された。

#### 例4

ヒトnNACHRサブユニットの哺乳類細胞中における組換え発現

ヒト胚腎臓 (HEK) 293細胞はヒト神経細胞性ニコチン性AChR  $\alpha 3$ および $\beta 4$

または $\alpha_7$ サブユニットをコードするDNAで一過性にまた安定にトランスフェクトされた。一過性のトランスフェクタントについて、様々なアッセイたとえば電気生理学的方法、 $\text{Ca}^{2+}$ -感受性蛍光指示薬ベースのアッセイおよび $[\text{I}^{125}]$ - $\alpha$ -ブングアロトキシン結合アッセイを用いてニコチン性AChRの発現を解析した。

### 1. HEK 細胞の一過性トランスフェクション

2回のトランスフェクションを実施した。一つのトランスフェクションでは、HEK細胞を $\alpha_3$ （プラスミドpCMV-KE  $\alpha_3$ ）および $\beta_4$ （プラスミドpCMV-KE  $\alpha_7$ ）サブユニットをコードするDNAで一過性にコトランスフェクトした。他のトランスフェクションでは、HEK細胞を $\alpha_7$ サブユニットをコードするDNAで一過性にコトランスフェクトした（プラスミドpCMV-KE  $\alpha_7$ ）。いずれのトランスフェクションでも約 $2 \times 10^6$  HEK細胞を標準 $\text{CaPO}_4$ トランスフェクション操作 [Wigler ら (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 1373-1376] に従って指示されたプラスミド $18 \mu\text{g}$ でトランスフェクトした。さらにCMVプロモーターに融合した大腸菌 $\beta$ ガラクトシダーゼ遺伝子を含むプラスミドpCMV $\beta$ gal (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA)  $2 \mu\text{g}$ をトランスフェクションの効率をモニターするためのレポーター遺伝子としてコトランスフェクトした。トランスフェクタントについて $\beta$ ガラクトシダーゼの活性を測定して、 $\beta$ ガラクトシダーゼの発現を解析した [Miller (1972) Experiment in Molecular Genetics, 352-355頁, Cold Spring Harbor Press]。トランスフェクタントはまた、 $\beta$ ガラクトシダーゼとX-gal基質が関与する反応の生成物を直接染色することによって $\beta$ ガラクトシダーゼの発現を解析することもできる [Jones (1986) EMBO 5: 3133-3142]。

HEK細胞のpCMV-KE  $\alpha_3$ /pCMV-KE  $\beta_4$ によるトランスフェクションの効率は標準効率の典型であり、HEK細胞のpCMV-KE  $\alpha_7$ によるトランスフェクションの効率は標準レベル以下であった。

### 2. HEK細胞の安定なトランスフェクション

HEK細胞をリン酸カルシウムトランスフェクション法を用いトランスフェクト

した [Current Protocols in Molecular Biology, Vol.1, Wiley Inter-Science, Supplement 14, Unit 9. 1, 1-9, 1. 9 (1990)] . 各1~2×

10<sup>6</sup>のHEK細胞を含有する10 cmプレートを、1 mlのDNA/9.5 μg pCMV-KE α3, 9.5 μg pCMV-KE β4 および1 μg pSVneo (選択マーカーとして) を含むリン酸カルシウム沈殿でトランスフェクトした。1 μg/mlのG418を含む培地中で14日間増殖させるとコロニーが形成し、これらを個々にクローニングシリンダーを用いて単離した。単離体を限界希釈に付し、下記のようにスクリーニングを行って最高レベルのニコチン性AChRを発現した単離体を同定した。

### 3. トランスフェクタントの解析

#### a. 蛍光指示薬ベースのアッセイ

リガンド依存性ニコチン性AChRのアゴニストによる活性化は、受容体チャンネルを通して、Ca<sup>2+</sup>を含む陽イオンの流入を招来する。チャンネルを通しての細胞内へのCa<sup>2+</sup>の流入は細胞内ストアに含まれるカルシウムの放出を誘導する。1価の陽イオンのチャンネルを通しての細胞内への流入も、膜の脱分極とそれに続く電位依存性のカルシウムチャンネルの活性化を通じて細胞質Ca<sup>2+</sup>レベルの上昇を招く。したがって、細胞内カルシウム濃度の一過性の上昇を検出する方法が機能性ニコチン性AChRの発現の解析に適用できる。細胞内カルシウム濃度の一つの測定方法はカルシウム感受性蛍光指示薬に依存するものである。

カルシウム感受性蛍光指示薬たとえばFluo-3 (カタログ番号F1241, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) は膜透過性のアセトキシメチルエステル型として利用される。指示薬のアセトキシメチルエステル型が細胞内に入った場合、エステル基はシトソールエステラーゼによって除去され、この場合、遊離の指示薬がシトソール中に捕捉される。遊離の指示薬のカルシウムとの相互作用により指示薬の蛍光が増大し、したがって、指示薬を含有する細胞の細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度は直接、蛍光の増大として表れる。ニコチン性AChRをアッセイするための自動蛍光検出システムは、同時に譲渡された係属中の米国特許出願 (PCT特許出願US92/11090に相当) に記載されている。

α3およびβ4, サブユニットをコードするDNAで一過性にまたは安定にコトラ

ンスフェクトされたHEK細胞について、自動蛍光指示薬ベースのアッセイを用い、機能性組換えニコチン性AChRの発現を解析した。

トランスフェクトされていないHEK細胞（またはpCMV-T7-2でトランスフェク

トされたHEK細胞）およびpCMV-KE  $\alpha 3$  / pCMV-KE  $\beta 4$ とコトランスフェクトされたHEK細胞を、96ウエルマイクロタイター皿のウエルにプレーティングし、HB（125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.8 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.62 mM  $\text{MgSO}_4$ , 6 mMのグルコース, 20 mM HEPES, pH7.4）中20  $\mu$ M fluo-3, 0.2%プルロン酸を含む培地中、20℃で2時間インキュベートしてfluo-3を負荷した。細胞をついでアッセイ緩衝液（すなわち、HES）で洗浄した。一部のウエルにはアンタゴニスト、d-ツボクラリンを10  $\mu$ M最終濃度で添加した。マイクロタイター皿をついで蛍光プレートリーダー中に置き、ウエルに200 pMのニコチンを添加する前に、各ウエルの基礎蛍光を測定し、記録した。ニコチンの添加後約60秒間にわたり反復してウエルの蛍光をモニターした。

トランスフェクトされていないHEK細胞（またはpCMV-T7-2でトランスフェクトされたHEK細胞）の蛍光はニコチンの添加後も変化しなかった。これに反して、コトランスフェクトした細胞の蛍光は、d-ツボクラリンの不存在下には、ウエルへのニコチンの添加後に劇的に上昇した。ニコチンの刺激によるこの蛍光の上昇は、アンタゴニストのd-ツボクラリンに暴露したコトランスフェクト細胞には認められなかった。これらの結果は、コトランスフェクトされた細胞が、ニコチンで活性化されd-ツボクラリンで遮断される機能性の組換えAChRを発現することを示している。

#### b. $\alpha$ -ブンガロトキシン結合アッセイ

pCMV-KE  $\alpha 7$ で一過性にトランスフェクトしたHEK細胞について [ $^{125}\text{I}$ ] - $\alpha$ -ブンガロトキシン (BgTx) の結合を解析した。トランスフェクトされた全細胞およびトランスフェクトされた細胞から調製された膜の両者をこれらのアッセイで調べた。アッセイには陽性対照としてラット脳の膜も包含させた。

ラットの脳の膜はHampsonら (1987) J. Neurochem. 49:1209の方



法によって調製した。膜はpCMV-KE  $\alpha$ 7でトランスフェクトしたHEK細胞から調製し、HEK細胞はPerez-Reyesら(1989) Nature 340:233の方法に従ってプラスミドpUC1のみで一過性にトランスフェクトした(陰性対照)。トランスフェクトした全細胞および陰性対照細胞は組織培養プレートを0.1% (w/v) BSAを含有するリン酸緩衝食塩溶液でスプレーして得られた。細胞はついで低速

で遠心分離し、1回洗浄し、アッセイ緩衝液(118 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1.2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 20 mM HEPES, 0.1% (w/v) BSA, 0.05% (w/v) バシトラシンおよび0.5 mM PMSF, pH 7.5)に再懸濁してカウントした。

ラット脳の膜への $[^{125}\text{I}]$ - $\alpha$ -BgTxの特異的結合は、いくつかの改変を加えたほかはほぼMarksら(1982) Molec. Pharmacol. 22:554-564の記載に従って測定した。膜はアッセイ緩衝液中で2回洗浄した。アッセイは、12×75 mmのポリエチレン試験管を用い総容量0.5 mlのアッセイ緩衝液中で実施した。膜は10 nMの $[^{125}\text{I}]$ - $\alpha$ -BgTx (New England Nuclear, Boston, MA)と1時間37℃でインキュベートした。ついでアッセイ混合物を2300×g, 4℃で10分間遠心分離した。上清を傾瀉し、ペレットを氷冷アッセイ緩衝液の2 mlアリコートで2回洗浄した。上清を再び傾瀉し、ペレットの放射能を $\gamma$ カウンターで測定した。非特異的結合は1  $\mu$ Mの標識 $\alpha$ -BgTxの存在下に測定した。特異的結合は総結合から非特異的結合を差し引いて求めた。トランスフェクトした細胞および陰性対照細胞から調製した膜への $[^{125}\text{I}]$ - $\alpha$ -BgTxの特異的結合はアッセイ緩衝液がBSA, バシトラシンおよびPMSHを含有しなかったほかはラット脳の膜への特異的結合の測定について記載したのと同様にして測定した。トランスフェクトした全細胞および陰性対照全細胞への $[^{125}\text{I}]$ - $\alpha$ -BgTxの特異的結合は、基本的にはラット脳の膜への特異的結合の測定の場合と同様にして測定した。 $[^{125}\text{I}]$ - $\alpha$ -BgTxの結合は、膜濃度およびインキュベーション時間の関数として評価された。ラット脳の膜への $[^{125}\text{I}]$ - $\alpha$ -BgTxの結合は膜の量(25~500  $\mu$ gの範囲)の増大とともに直線的に増大した。結合の全体的なシグナル対ノイズ比(すなわち、総結合と非特異的結合の比)は3:1であった。ラン

スフェクトされた細胞膜に対する  $[^{125}\text{I}] - \alpha\text{-BgTx}$  の結合はある程度検出されたが、大部分が比特異的結合であり、膜の量を増加させても増大しなかった。トランスフェクタントおよび陰性対照細胞への  $[^{125}\text{I}] - \alpha\text{-BgTx}$  の結合は同様であると思われた。

ラット脳の膜ならびにトランスフェクトされた全細胞および陰性対照全細胞への  $[^{125}\text{I}] - \alpha\text{-BgTx}$  の結合をモニターするために、 $300\mu\text{g}$  の膜または  $500$

$000$  個の細胞をそれぞれ  $1\text{nM}$  または  $10\text{nM}$  の  $[^{125}\text{I}] - \alpha\text{-BgTx}$  と、 $37^\circ\text{C}$  で、 $0\sim350$  分の様々な時間インキュベートした。アッセイ混合物のアリコートを経験的な時点で  $1.5\text{ml}$  のマイクロ遠心管に移し、遠心分離した。ペレットはアッセイ緩衝液で2回洗浄した。ラット脳の膜への  $[^{125}\text{I}] - \alpha\text{-BgTx}$  の結合は時間とともに増加し、3時間後に最大に達した。トランスフェクトされた細胞および陰性対照細胞への結合像は同一で、ラット脳の膜の場合とは異なっていた。

#### 例5

##### nNACHRを発現する細胞系の特性

ヒト神経細胞性ニコチン性AChRをコードするDNAでのトランスフェクションによって生成した組換え細胞系、たとえば例3の細胞系は、以下の1または2以上の方法でさらにそれを特性づけることができた。

##### A. $\alpha$ および/または $\beta$ サブユニットをコードするメッセージの発現のノーザンまたはスロットプロット解析

約  $1 \times 10^7$  個の細胞から全RNAを単離し、各細胞タイプからの  $10\sim15\mu\text{g}$  をノーザンまたはスロットプロット解析に使用した。ヒト神経細胞性nNACHR-コードプラスミドからの挿入体はニックトランスレーションに付し、プローブとして使用した。さらに、 $\beta$  アクチン遺伝子配列 [Clevelandら (1980) Cell 20: 95-105] もニックトランスレーションに付し、各プロット上のRNAの存在または不存在を確認するための二重フィルターにおいて、また細胞系間で  $\alpha$  または  $\beta$  特異的mRNAレベルにおける差の定量化に使用するラフな標準を与えるために、対照プローブとして使用した。通常のノーザンまたはスロットプロットハイ

ブリダイゼーションおよび洗浄条件は次の通りである。

ハイブリダイゼーション：5×SSPE，5×デンハルト溶液，50%ホルムアミド，42℃，洗浄：0.2×SSPE，0.1% SDS，65℃。

#### B. ニコチン結合アッセイ

ヒト神経細胞性ニコチン性AChR $\alpha$ または $\alpha$ および $\beta$ サブユニットコードDNAによるトランスフェクションで生成した細胞系について，それらのニコチン結合能を，たとえば対照細胞系：神経細胞由来の細胞系PC12 [Boulterら (1986)]，前出，ATCC# CRL 1721] およびIMR32 [Clementiら (1986)]，

Int. J. Neurochem. 47: 291-297, ATCC# CCL 127]，ならびに筋由来細胞系 BC3H1 [Patrickら (1977), J. Biol. Chem. 252: 2143-2153]と比較して解析した。陰性対照細胞（すなわち，トランスフェクタントを作成した宿主細胞）もアッセイに包含させた。アッセイは次のように実施する。

アッセイの直前に，トランスフェクト細胞はプレートから掻き落として採取する。使用した陽性対照はPC12，BC3H1，およびIMR32である（これらは7日間新鮮培地で飢餓させた）。対照細胞系は37℃のアッセイ緩衝液（50 mM Tris/HCl，1 mM MgCl<sub>2</sub>，2 mM CaCl<sub>2</sub>，120 mM NaCl，3 mM EDTA，2 mg/ml および0.1% アトロピンF，pH 7.4）中37℃でリンスして採取する。細胞は洗浄し， $1 \times 10^6 / 250 \mu^l$ に再懸濁する。各プラスチック試験管に $250 \mu^l$ の細胞溶液， $15 \text{ nM } ^3\text{H}$ -ニコチンを加え，これに1 mMの非標識ニコチンを加えまたは加えないで，アッセイ緩衝液により最終容量を $500 \mu^l$ とする。トランスフェクトされた細胞系のアッセイでは室温で30分間インキュベートし，陽性対照細胞のアッセイでは1℃で，2分間インキュベートする。適当なインキュベーション時間後に，アッセイ容量の $450 \mu^l$ アリコートをし，0.05% ポリエチレンイミン中，4℃で24時間インキュベートして前処置したWhatman GF/Cガラス繊維フィルターを通してろ過する。ついでフィルターを各回4 mlの氷冷アッセイ緩衝液で2回洗浄する。洗浄後，フィルターを乾燥し，5 mlのシンチレーション溶液を含むバイアル中に取り，放射能を測定する。

### C. $^{86}\text{Rb}$ イオン流量アッセイ

トランスフェクトされた細胞および対照細胞中への $^{86}\text{Rb}$ の流入を仲介するニコチンまたはニコチンアゴニストおよびアンタゴニストの能力は、細胞表面における機能性AChRの存在の指示を提供することが見出された。 $^{86}\text{Rb}$ イオン流入アッセイは次のように実施する。

1. 実験の前夜に、6ウエルのポリリジンコートプレート中に $2 \times 10^6$ /ウエル（すなわち、各ウエルあたり2 ml）の細胞をプレーティングする。

2. 培地を傾瀉し、プレートを2 mlのアッセイ緩衝液（50 mM HEPES, 260 mMスクロース, 5.4 mM KCl, 1.8 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.8 mM  $\text{MgSO}_4$ , 5.5 mMグル

コース）により室温で洗浄する。

3. アッセイ緩衝液を傾瀉し、 $3 \mu\text{Ci}$ の $^{86}\text{Rb}$ を含有するアッセイ緩衝液1 mlを5 mMのウアバインおよび最大応答を生じる濃度のアゴニストまたはアンタゴニストとともに加える。

4. プレートを氷上、 $1^\circ\text{C}$ で、2分間インキュベートする。

5. 緩衝液を廃液容器中に傾瀉して、各ウエルを3 mlのアッセイ緩衝液で洗浄し、ついで各2 mlで2回洗浄する。

6. 各ウエルあたり $2 \times 0.5 \text{ ml}$ の0.2% SDSを加えて細胞を溶解し、5 mlのシンチレーション溶液を含むシンチレーションバイアル中に移す。

7. 各バイアル中に含まれる放射能を測定し、データを計算する。

このアッセイで陽性対照細胞は以下のデータを与えた。

	PC12		IMR32	
	EC <sub>50</sub>	最大応答	EC <sub>50</sub>	最大応答
アゴニスト				
ニコチン	52 $\mu$ M	2.1 $\times$ <sup>a</sup>	18 $\mu$ M	7.7 $\times$ <sup>a</sup>
CCh <sup>*</sup>	35 $\mu$ M	3.3 $\times$ <sup>b</sup>	230 $\mu$ M	7.6 $\times$ <sup>c</sup>
シチシン	57 $\mu$ M	3.6 $\times$ <sup>d</sup>	14 $\mu$ M	10 $\times$ <sup>e</sup>
アンタゴニスト				
d-ツボクラリン	0.81 $\mu$ M <sup>0</sup>		2.5 $\mu$ M	
メカミルアミン	0.42 $\mu$ M		0.11 $\mu$ M	
ヘキサメトニウム	nd <sup>f</sup>		22 $\mu$ M	
アトロピン	12.5 $\mu$ M		43 $\mu$ M	

<sup>\*</sup> CCh = カルバミルコリン

<sup>a</sup> 200  $\mu$ M ニコチン

<sup>b</sup> 200  $\mu$ M CCh

<sup>c</sup> 3 mM CCh

<sup>d</sup> 1 mM シチシン

<sup>e</sup> 100  $\mu$ M シチシン

<sup>f</sup> nd=測定せず

#### D. ヒト神経細胞性ニコチン性AChRサブユニットコードDNAでトランスフェクトした哺乳類細胞の電気生理学的解析

電気生理学的測定は、組換え受容体の活性の評価、および試験化合物がリガンド依存性の組換えAChRを介して陽イオンの流入の大きさおよび持続に強化、拮抗または他の修飾を与える能力の評価に用いた。発現した神経細胞性AChRの機能は様々な電気生理学的技法、たとえば二電極固定電位法およびパッチクランプ法で評価できる。AChRに固有の陽イオン伝導チャンネルはアセチルコリン (ACh) またはニコチン性コリン作動性アゴニストに応答して開口し、生理的条件下には優先的にナトリウムおよびカリウムイオンによって行われる膜透過電流を発生させる。この電流は直接固定電位法でモニターできる。好ましい実施態様においては、トランスフェクトされた哺乳類細胞または注入された卵母細胞において、AChRアゴニスト依存性の電流の存在が電気生理学的に解析される。

以上、本発明を、一部の好ましい実施態様について詳細に説明したが、その修飾および改変は、記載され請求された本発明の精神および範囲に包含されるものであることを理解すべきである。

#### 配列の要約

配列番号：1はヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体の $\alpha_2$ サブユニットをコードするヌクレオチド配列である。

配列番号：2は配列番号：1に掲げたヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体の $\alpha_2$ サブユニットをコードするヌクレオチド配列から推定されたアミノ酸配列である。

配列番号：3はヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体の $\alpha_3$ サブユニットをコードするヌクレオチド配列である。

配列番号：4は配列番号：3に掲げたヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体の $\alpha_3$ サブユニットをコードするヌクレオチド配列から推定されたアミノ酸配列である。

配列番号：5はヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体の $\alpha_4$ サブユニットをコードするヌクレオチド配列である。

配列番号：6は配列番号：5に掲げたヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体の $\alpha_4$ サブユニットをコードするヌクレオチド配列から推定されたアミノ酸配列である。

配列番号：7はヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体の $\alpha_7$ サブユニットをコードするヌクレオチド配列である。

配列番号：8は配列番号：7に掲げたヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体の $\alpha_7$ サブユニットをコードするヌクレオチド配列から推定されたアミノ酸配列である。

配列番号：9はヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体の $\beta_2$ サブユニットをコードするヌクレオチド配列である。

配列番号：10は配列番号：9に掲げたヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体の $\beta_2$ サブユニットをコードするヌクレオチド配列から推定されたア

ミノ酸配列である。

配列番号：11はヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体の $\beta_4$ サブユニットをコードするヌクレオチド配列である。

配列番号：12は配列番号：11に掲げたヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体の $\beta_4$ サブユニットをコードするヌクレオチド配列から推定されたアミノ酸配列である。

### 配列表

配列番号：1

配列の長さ：2277

配列の型：核酸

鎖の数：両者

トポロジー：両者

配列の種類：cDNA

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：166...1755

他の情報：生成物= $\alpha_2$ サブユニット

配列

CAATGACCTG TTTTCTTCTG TAACCACAGG TTGGGTGCTG AGAGGAASCY TCGCAGAATC	60
CAGCAGAATC CTCACAGAAT CCAGGAGCAG CTCTGCTGGG GACATGCTCC ATGCTGCAAC	120
CCACAGCAAA GGCCTGACCT GACCTCCTGA TGCTCAGGAG AAGCCATGGG CCCCTCCTGT	180
CCTGTGTTCC TGTCTTCAC AAAGCTCAGC CTGTGGTGGC TCCTTCTGAC CCCAGCAGGT	240
GGAGAGGAAG CTAAGCGCCC ACCTCCCAGG GCTCCTGGAG ACCCACTCTC CTCTCCCACT	300
CCCACGGCAT TGCCGCAGGG AGGCTCCCAT AGCCAGACTG AGGACCGGCT CTTCAAACAC	360
CTCTTCGGG CCTACAACCG CTGGCGGGG CCGGTGCCCC ACACCTCAGA CGTGGTGATT	420
GTGGCGTTTG GACTGTCCAT CGCTCAGCTC ATCGATGTGG ATGAGAAGAA CCAAATGATG	480
ACCACCAACG TCTGGCTAAA ACAGGAGTGG AGCCACTACA AACTGCGCTG GAACCCCGCT	540
GATTTTGGCA ACATCACATC TCTCAGGGTC CCTTCTGAGA TGATCTGGAT CCCCACATT	600
GTCTCTIACA ACAATGCAGA TGGGGAGTTT GCAGTGACCC ACATCACCAA CCCCCACCTC	660
TTCTGCAGGG GCACTGTGCA CTGGGTGCCC CCGCCCATCT ACAAGAGCTC CTGCAGCATC	720
GACGTCACCT TCTTCCGCTT CGACCAGCAG AACTGCAAGA TGAAGTTTGG CTCCTGGACT	780
TATGACAAGG CCAAGATCGA CCTCGACCAG ATGGACCAGA CTGTGCACCT GAAGCACTAC	840
TGGGAGAGCG GCGAGTGGG CATCGTCAAT GCCACGGGCA CCTACAACAG CAAGAAGTAC	900



GA CTGCTGCC CGGAGATCTA CCGCGAGCTC ACCTACGGCT TCGTCATCCG GCGGCTGCGG	960
CTCTTCTACA CCATCAACCT CATCATCCCC TGCCTGCTCA TCTCCTGCCT CACTGTGCTG	1020
GTCTTCTIACC TGGCCTCCGA CTGCGGCGAG AAGATCAGCG TGTGCATTTC GGTGCTGCTG	1080
TCACTCACCG TCTTCTGCT GTCATCACT GAGATCATCC CGTCCACCTC GCTGCTCATC	1140
CGGCTCATCG GCGAGTACCT GCTGTTACCG ATGATCTTCG TCACCTGTC CATGTCATC	1200
ACCGTCTTCC TGCTCAATGT GCACACCCG TCCCCAGCA CCCACACCAT CCCCCACTGG	1260
GTGCGGGGGG CCCTTCTGGG CTGTGTGCCC CGGTGGCTTC TGATGAACCG GCGCCGACCA	1320
CCCGTGGAGC TCTGCCACCC CCTACGGCTG AAGCTCAGCC CCTCTTATCA CTGGCTGGAG	1380
AGCAACCTCG ATGCCGAGGA GAGGGAGGTG GTGGTGGAGG AGGAGGACAG ATGGGCATCT	1440
GCAGGTCATG TGGCCCCCTC TGTTGGCACC CTCTGCAGCC ACGGCGACCT GCACTCTGGG	1500
GCCTCAGGTC CCAAGGCTGA GGCTCTGCTG CAGGAGGGTG AGCTGCTGCT ATCACCCAC	1560
ATGCAGAAGG CACTGGAAGG TGTGCACTAC ATTGCCGACC ACCTGCGGTC TGAGGATGCT	1620
GACTCTTCGG TGAAGGAGGA CTGGAAGTAT GTTGCCATCG TCATCGACAG CATCTTCCTC	1680
TGGTGTTTA TCATCGTCTG CTTCCTGGGG ACCATCGGCC TCTTCTGCC TCGGTTCTTA	1740
GCTGCAATGA TCTCACTGCA CCTCCCTCGA CCTGCTCCC AGGGCAAAGG GGAGGGTTCT	1800
TGGATCTGGA AGGGCTTTGA ACAATGTTTA GATTGGAAGA TGAGCCCAA GTGCCAGGGA	1860
GAACAGCCAG GTGAGGTGGG AGGTGGAAGA GCCAGGTGAG GTCTCTCTAA GTCAGGCTCG	1920
GGTGAAGTT TGGAGTCTGT CCCAGTTTCC AGCGTGCTGA GCTGTATGGT CGAGCAGGGG	1980
AGTAATAACC GCTCTTCCGG AAGGGGAGGA AGCGGGAGCG AGGGCCTGCA CCTGATGTGG	2040
AGGTACAGCG CAGATCTTCC CTACCGGGGA GGGATGCATG GTTGGATACA GCTGCTGCG	2100
CTATTCCATC CATCTGGAAG CACATTGAG CCTCCAGGCT TCTCCTTCAC GTCATTGCTC	2160
TGCTTCCTTC CTCCAAAATG GCTCTCCACC AGCGGGCCCC CAGGAGCTCT GGCAGAGCTG	2220
ACAGCCATCG CCTGCAGGGG CTCCATATGT CCTACGGCT GCAGCAGGCA AACAAGA	2277

配列番号：2

配列の長さ：529

配列の型：アミノ酸

トポロジー：不明

## 配列の種類：タンパク質

## 配列

Met	Gly	Pro	Ser	Cys	Pro	Val	Phe	Leu	Ser	Phe	Thr	Lys	Leu	Ser	Leu	1	5	10	15
Trp	Trp	Leu	Leu	Leu	Thr	Pro	Ala	Gly	Gly	Glu	Glu	Ala	Lys	Arg	Pro	20	25	30	
Pro	Pro	Arg	Ala	Pro	Gly	Asp	Pro	Leu	Ser	Ser	Pro	Ser	Pro	Thr	Ala	35	40	45	
Leu	Pro	Gln	Gly	Gly	Ser	His	Thr	Glu	Thr	Glu	Asp	Arg	Leu	Phe	Lys	50	55	60	
His	Leu	Phe	Arg	Gly	Tyr	Asn	Arg	Trp	Ala	Arg	Pro	Val	Pro	Asn	Thr	65	70	75	80
Ser	Asp	Val	Val	Ile	Val	Arg	Phe	Gly	Leu	Ser	Ile	Ala	Gln	Leu	Ile	85	90	95	
Asp	Val	Asp	Glu	Lys	Asn	Gln	Met	Met	Thr	Thr	Asn	Val	Trp	Leu	Lys	100	105	110	
Gln	Glu	Trp	Ser	Asp	Tyr	Lys	Leu	Arg	Trp	Asn	Pro	Ala	Asp	Phe	Gly	115	120	125	
Asn	Ile	Thr	Ser	Leu	Arg	Val	Pro	Ser	Glu	Met	Ile	Trp	Ile	Pro	Asp	130	135	140	
Ile	Val	Leu	Tyr	Asn	Asn	Ala	Asp	Gly	Glu	Phe	Ala	Val	Thr	His	Met	145	150	155	160
Thr	Lys	Ala	His	Leu	Phe	Ser	Thr	Gly	Thr	Val	His	Trp	Val	Pro	Pro	165	170	175	
Ala	Ile	Tyr	Lys	Ser	Ser	Cys	Ser	Ile	Asp	Val	Thr	Phe	Phe	Pro	Phe	180	185	190	
Asp	Gln	Gln	Asn	Cys	Lys	Met	Lys	Phe	Gly	Ser	Trp	Thr	Tyr	Asp	Lys	195	200	205	
Ala	Lys	Ile	Asp	Leu	Glu	Gln	Met	Glu	Gln	Thr	Val	Asp	Leu	Lys	Asp	210	215	220	
Tyr	Trp	Glu	Ser	Gly	Glu	Trp	Ala	Ile	Val	Asn	Ala	Thr	Gly	Thr	Tyr	225	230	235	240

Asn Ser Lys Lys Tyr Asp Cys Cys Ala Glu Ile Tyr Pro Asp Val Thr  
 245 250 255  
 Tyr Ala Phe Val Ile Arg Arg Leu Pro Leu Phe Tyr Thr Ile Asn Leu  
 260 265 270  
 Ile Ile Pro Cys Leu Leu Ile Ser Cys Leu Thr Val Leu Val Phe Tyr  
 275 280 285  
 Leu Pro Ser Asp Cys Gly Glu Lys Ile Thr Leu Cys Ile Ser Val Leu  
 290 295 300  
 Leu Ser Leu Thr Val Phe Leu Leu Leu Ile Thr Glu Ile Ile Pro Ser  
 305 310 315 320  
 Thr Ser Leu Val Ile Pro Leu Ile Gly Glu Tyr Leu Leu Phe Thr Met  
 325 330 335  
 Ile Phe Val Thr Leu Ser Ile Val Ile Thr Val Phe Val Leu Asn Val  
 340 345 350  
 His His Arg Ser Pro Ser Thr His Thr Met Pro His Trp Val Arg Gly  
 355 360 365  
 Ala Leu Leu Gly Cys Val Pro Arg Trp Leu Leu Met Asn Arg Pro Pro  
 370 375 380  
 Pro Pro Val Glu Leu Cys His Pro Leu Arg Leu Lys Leu Ser Pro Ser  
 385 390 395 400  
 Tyr His Trp Leu Glu Ser Asn Val Asp Ala Glu Glu Arg Glu Val Val  
 405 410 415  
 Val Glu Glu Glu Asp Arg Trp Ala Cys Ala Gly His Val Ala Pro Ser  
 420 425 430  
 Val Gly Thr Leu Cys Ser His Gly His Leu His Ser Gly Ala Ser Gly  
 435 440 445  
 Pro Lys Ala Glu Ala Leu Leu Gln Glu Gly Glu Leu Leu Leu Ser Pro  
 450 455 460  
 His Met Gln Lys Ala Leu Glu Gly Val His Tyr Ile Ala Asp His Leu  
 465 470 475 480  
 Arg Ser Glu Asp Ala Asp Ser Ser Val Lys Glu Asp Trp Lys Tyr Val  
 485 490 495  
 Ala Met Val Ile Asp Arg Ile Phe Leu Trp Leu Phe Ile Ile Val Cys  
 500 505 510  
 Phe Leu Gly Thr Ile Gly Leu Phe Leu Pro Pro Phe Leu Ala Gly Met  
 515 520 525  
 Ile

配列番号：3

配列の長さ：1757

配列の型：核酸

鎖の数：両者

トポロジー：両者

配列の種類：cDNA

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：39...1553

他の情報：生成物 =  $\alpha_3$  サブユニット

配列

CCGACCGCTCC GCGTCCGCGG CCAGCCCGGG CACCACCCAT GGGCTCTGGC CCGCTCTCGC	60
TGCCCCCTGGC GCTGTGCGCG CCGCGGCTGC TGCTGCTGCT CCTGTCTCTG CTGCCAGTGG	120
CCAGGGCCCTC AGAGCCTCAG CACCGTCTAT TTGACCGGCT GTTTGAAGAT TACAATGAGA	180
TCATCCGGCC TGTAGCCAAC GTGTCTGACC CAGTCATCAT CCATTTCGAC CTCTCCATCT	240
CTCAGCTGGT GAAGCTGGAT GAAGTAAACC AGATCATGCA CACCAACCTG TGGTCAAGC	300
AAATCTGGAA TGA CTACAAG CTGAAGTGA ACCCCTCTGA CTATGGTGGC GCAGACTTCA	360
TGCGTCTCCC TGACAGAAAG ATCTGGAAGC CAGACATTGT GCTGTATAAC AATGCCTTG	420
GGGATTTCGA GGTGGACGAC AAGACCAAAG CCTTACTCAA CTACACTGGG CAGGTGACTT	480
GGATACCTCC GCGCATCTTT AAGAGCTCCT GTAAAAATCGA CGTGACCTAC TTCCCGTTTG	540
ATTACCAAAA CTGTACCATC AAGTTCGGTT CCTGGTCTTA CGATAAGCCG AAAATCGATC	600
TGGTCCTGAT CCGGTCTTCC ATGAACCTCA AGGACTATTG GGAGAGCGGC GAGTGGCCCA	660
TCATCAAAGC CCCAGGCTAC AAACAGGACA TCAAGTACAG CTGCTGGGAG GAGATCTACC	720
CCGACATCAC ATACTCGCTG WWCATCCGGC GCCTGTCTTT GTTCTACACC ATCAWCTCA	780
TCATCGGCTG GGTGATCATC TCCTTCATCA CTGTGGTGGT CTCCTACCTG CCCTCGGACT	840
GGGGCGAGAA GGTGACCCTG TGYATTTCTG TCCTCCTCTC CCTGACGGTG TTTCTCTTGG	900
TGATCACTGA GACCATCCCT TCCACCTGGC TGGTCATCCC CCTGATTGGA GAGTACCTCC	960
TGWWCACCAT GATTGTGTA ACCTTCTCCA TCGACATCAC CGTCTGGGTG CTCAACGTGC	1020
ACTACAGAAC CCCGACGACA CACACAATGC CCTCATGGGT GAAGACTCTA TTCTTGAMCC	1080

TGCTCCCCAG GGTGATGTWC ATGACCAGGC CAACAACCAA CGAGGGCAAC GCTCACAACC 1140  
 CGAGGGCCCT CTACGGTGGC GAGCTCTCAA ATCTGAATTG CTTAGCCGC GCAGAGTGCA 1200  
 AAGGCTGCAA GGAGGGCTAC CCTGCCAGG ACGGGATGTG TGGTTACTGC CACCACGGCA 1260  
 GGATAAAAAAT CTCCAATTC AGTGCTAACC TCAGGAGAAG CTCTAGTTCT GAATCTGTTG 1320  
 ATGCTGTGCT GTCCCTCTCT GCTTTGTGAC CAGAAATCAA AGAAGCGATC CAAAGTGTCA 1380  
 AGTATATTGC TGAATATATC AAAGCACAAA ATGAACCCAA AGACATTCAA CATGATTGCA 1440  
 AGTATGTTGC CATGGTGATT GATCGIATTT TTCTGTGGGT TTTCACCGTG GTGIGCATTC 1500  
 TAGGGACAGC AGGATTGTTT CTGCAACCCC TGATGGCCAG GGAAGATCCA TAAGGACTAA 1560  
 GCTGTGTGCC TGCCTGGGAG ACTTCCTTGT GTCAGGGCAG GACGAGCCTC CTTCTACTA 1620  
 AGAACGTAAT TTCTGTTATC AAGCTACCAG CTTTGTITTK GCCATTTCGA GGTIIACTTA 1680  
 TTTTGCACIT ATCTTGAAT CATGCCGCNN NNAATGTCA AGAGTATTTA TTACCGATAA 1740  
 ATGAACATTT AACTIAGC 1757

配列番号：4

配列の長さ：504

配列の型：アミノ酸

トポロジー：不明

配列の種類：タンパク質

配列

Met Gly Ser Gly Pro Leu Ser Leu Pro Leu Ala Leu Ser Pro Pro Arg  
 1 5 10 15  
 Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ser Leu Leu Pro Val Ala Arg Ala Ser Glu  
 20 25 30  
 Ala Glu His Arg Leu Phe Glu Arg Leu Phe Glu Asp Tyr Asn Glu Ile  
 35 40 45  
 Ile Arg Pro Val Ala Asn Val Ser Asp Pro Val Ile Ile His Phe Glu  
 50 55 60  
 Val Ser Met Ser Gln Leu Val Lys Val Asp Glu Val Asn Gln Ile Met  
 65 70 75 80  
 Glu Thr Asn Leu Trp Leu Lys Gln Ile Trp Asn Asp Tyr Lys Leu Lys  
 85 90 95  
 Trp Asn Pro Ser Asp Tyr Gly Gly Ala Glu Phe Met Arg Val Pro Ala  
 100 105 110

Gln Lys Ile Trp Lys Pro Asp Ile Val Leu Tyr Asn Asn Ala Val Gly  
 115 120 125  
 Asp Phe Gln Val Asp Asp Lys Thr Lys Ala Leu Leu Lys Tyr Thr Gly  
 130 135 140  
 Glu Val Thr Trp Ile Pro Pro Ala Ile Phe Lys Ser Ser Cys Lys Ile  
 145 150 155 160  
 Asp Val Thr Tyr Phe Pro Phe Asp Tyr Gln Asn Cys Thr Met Lys Phe  
 165 170 175  
 Gly Ser Trp Ser Tyr Asp Lys Ala Lys Ile Asp Leu Val Leu Ile Gly  
 180 185 190  
 Ser Ser Met Asn Leu Lys Asp Tyr Trp Glu Ser Gly Glu Trp Ala Ile  
 195 200 205  
 Ile Lys Ala Pro Gly Tyr Lys His Asp Ile Lys Tyr Ser Cys Cys Glu  
 210 215 220  
 Glu Ile Tyr Pro Asp Ile Thr Tyr Ser Leu Xaa Ile Arg Arg Leu Ser  
 225 230 235 240  
 Leu Phe Tyr Thr Ile Xaa Leu Ile Ile Arg Trp Leu Ile Ile Ser Phe  
 245 250 255  
 Ile Thr Val Val Val Ser Tyr Leu Pro Ser Asp Cys Gly Glu Lys Val  
 260 265 270  
 Thr Leu Cys Ile Ser Val Leu Leu Ser Leu Thr Val Phe Leu Leu Val  
 275 280 285  
 Ile Thr Glu Thr Ile Pro Ser Thr Ser Leu Val Ile Pro Leu Ile Gly  
 290 295 300  
 Glu Tyr Leu Leu Xaa Thr Met Ile Cys Val Thr Leu Ser Ile Asp Ile  
 305 310 315 320  
 Thr Val Cys Val Leu Asn Val His Tyr Arg Thr Pro Thr Thr His Thr  
 325 330 335  
 Met Pro Ser Trp Val Lys Thr Val Phe Leu Xaa Leu Leu Pro Arg Val  
 340 345 350  
 Met Xaa Met Thr Arg Pro Thr Ser Asn Glu Gly Asn Ala Gln Lys Pro  
 355 360 365  
 Arg Pro Leu Tyr Gly Ala Glu Leu Ser Asn Leu Asn Cys Phe Ser Arg  
 370 375 380  
 Ala Glu Ser Lys Gly Cys Lys Glu Gly Tyr Pro Cys Gln Asp Gly Met  
 385 390 395 400  
 Cys Gly Tyr Cys His His Arg Arg Ile Lys Ile Ser Asn Phe Ser Ala  
 405 410 415

Asn Leu Thr Arg Ser Ser Ser Ser Glu Ser Val Asp Ala Val Leu Ser  
                     420                    425                    430  
 Leu Ser Ala Leu Ser Pro Glu Ile Lys Glu Ala Ile Gln Ser Val Lys  
                     435                    440                    445  
 Tyr Ile Ala Glu Asn Met Lys Ala Gln Asn Glu Ala Lys Glu Ile Gln  
                     450                    455                    460  
 Asp Asp Trp Lys Tyr Val Ala Met Val Ile Asp Arg Ile Phe Leu Trp  
                     465                    470                    475                    480  
 Val Phe Thr Leu Val Cys Ile Leu Gly Thr Ala Gly Leu Phe Leu Gln  
                     485                    490                    495  
 Pro Leu Met Ala Arg Glu Asp Ala  
                     500

配列番号：5

配列の長さ：2363

配列の型：核酸

鎖の数：両者

トポロジー：両者

配列の種類：cDNA

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：173...2056

他の情報：生成物 =  $\alpha$ 4サブユニット

配列

GCGCTCGCTG CGCGCGCGCC GCCGCNCCGC GCGCCACAGG AGAAGCCGAN CCGGGCCCGC	60
CGGCGCAAGC GCCCGCGGAC GCGCGGAGG CATGAACTTG GCGCGGCACG GGCCTCGAAG	120
CGGGGGGAG CGGGGAGCCG CCCGCATCTA GAGCCCGCGA GGTGCGTGCG CCATGGAGCT	180
AGGGGGCCCC GGAGCGCCCC GGCTGCTGCC GCGGCTGCTC CTGCTTCTCG GGACCGGCCT	240
CCTGGCGCCG AGCAGCCATC TCGAGACCCC GCGCCACGCC GAGGAGCGGC TCCTGAAGAA	300
ACTCTTCTCC GGTACAACA AGTGGTCCCG ACCCGTGGCC AACATCTCGG ACCTGCTCCT	360
CGTCCGCTTC GGCCTGTCCA TCGCTCAGCT CATTGACGTG GATGAGAAGA ACCAGATGAT	420
GACCAGGAAC GTCTGGTGA AGCAGGAGTG GCACCACTAC AAGCTCGCT GGGACCCAGC	480

TGACTATGAG AATGTCACCT CCATCCGCAT CCCCTCCGAC CTCATCTGGC GGCCCGACAT	540
CGCCCTCTAC AACAATGCTC ACCCGGACTT CGCCGCCACC CACCTGACCA AGGCCACCT	600
GTTCGATGAC GGGCGGGTGC AGCGGACTCC CCGGGCCATT TACAAGAGCT CCTGCAGCAT	660
CGACGTCACC TTCTTCCCCT TCGACCAGCA GAACTGCACC ATGAAATTCG GCTCCTCGAC	720
CTAGGACAAG GCCAAGATCG ACCTGGTGAA CATGCACAGC CGCGTGGACC ACCTGGACTT	780
CTGCCAGACT GCGGAGTGGC TCATCTCGGA CGCCGTGGGC ACCTACAACA CCAGGAAGTA	840
CGAGTGTGCG GCGGAGATCT ACCCGGACAT CACCTATGCC TACGCCATCC GGCGGCTGCC	900
GCTCTTCTAC ACCATCAACC TCATCATCCC CTGGCTGCTC ATCTCCTGCC TCACCGCGCT	960
GGTCTTCTAC CTGCCCTCCG AGTGTGGCGA GAAGATCAGC CTGTGCATCT CCGTCTCTCT	1020
CTCGCTCACC GTCTTCCCTC TCCTCATCAC CGAGATCATC CCGTCCACCT CACTGGTCAT	1080
CGCACTCATC GGGGAGTACC TGCTGTTTAC CATGATCTTC CTCACCTCTT CCATCGCCAT	1140
CACGGTCTTC GTGCTCAACG TGCACCACCG CTCGCCACGC ACCCACACCA TGCCACCTC	1200
GGTACGCAGG GTCTTCCCTG ACATCGTGGC ACGGCTGCTC CTCATGAAGC GGCGGTCCGT	1260
GGTCAAGGAC AATTGCCGGC GGCTCATCGA GTCCATGCAT AAGATGGCCA GTGCCCCGGC	1320
CTTCTGGCCC GAGCCACAAG GGGAGCCCCC TGCCACGAGC GGCACCCAGA GCCTGCACCC	1380
TCCCTCACCG TCCTTCTGCG TCCCGGTGGA TGTGCCGGCT GAGCCTGGGC CTTCCTGCAA	1440
CTCACCTCC GACCAGCTCC CTCCTCAGCA GCGCCTGGAA GCTGAGAAAG CCAGCCCCCA	1500
CCCCTCGCT GGACCTGCC GCGCGCCCCA CCGCACCCAG CCACCAGGC TGCCCAAAGC	1560
CAGGTCCTC AGCGTCCAGC ACATGTCCAG CCTTGGCGAA GCGGTGGAAG GCGGCTCCG	1620
GTGCCGGTCT CGGAGCATCC AGTACTGTGT TCCCCGAGAC GATGCCGCCC CCGAGGCAGA	1680
TGGCCAGGCT GCGGGGCCCC TGGCCTCTCG CAACAGCCAC TCGGCTGAGC TCCACCCCC	1740
AGACCACCCC TCTCCCTGCA AATGCACATG CAAGAAGGAG CCTCTTCCG TGTCCCCGAG	1800
CGCCACGGTC AAGACCCGCA GCACCAAAGC GCGCGCGCG CACCTGCCCC TGTGCGCGGC	1860
CCTGAGCCGG GCGGTGGAGC GCGTCCAGTA CATTGCAGAC CACCTGAAGC CCGAAGACAC	1920
AGACTTCTCG GTCAAGCAGC ACTCGAAGTA CGTGGCCATC CTCATCGACC GCATCTTCCT	1980
CTGGATGTTT ATCATCGTCT GCGTGTGGG GACGGTGGGC CTCTTCTGC GCGCCTGGCT	2040
GGCTGGCATG ATCTAGGAAG GGACCGGGAG CCTGCGTGGC CTGGGGCTGC GGYGCACGGG	2100
GCCAGCATCC ATGCGGCCCC CCTGGGGCCG GGCTGGCTTC TCCCTGGACT CTGTGGGGCC	2160



ACACCTTTGC CAAATTTTCC TTCCTGTCTT GTCTCTGCTC TAAGACGGCC TTGCACCGCC 2220  
 ACACGGGCTC TGGGGACACC GACTGTGGAG CTGCTTCCAG TTGGACTCTS GCTCAGNAG 2280  
 GCAGCGGCTT GGAGCAGAGG TGGCGGTCCG CGCCTYCTAC CTGCAGGACT CGGGCTAAGT 2340  
 CCAGCTCTCC CCTTGGCCAG CCC 2363

配列番号：6

配列の長さ：627

配列の型：アミノ酸

トポロジー：不明

配列の種類：タンパク質

配列

Met Glu Leu Gly Gly Pro Gly Ala Pro Arg Leu Leu Pro Pro Leu Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Leu Leu Gly Thr Gly Leu Leu Arg Ala Ser Ser His Val Glu Thr  
 20 25 30  
 Arg Ala His Ala Glu Glu Arg Leu Leu Lys Lys Leu Phe Ser Gly Tyr  
 35 40 45  
 Asn Lys Trp Ser Arg Pro Val Ala Asn Ile Ser Asp Val Val Leu Val  
 50 55 60  
 Arg Phe Gly Leu Ser Ile Ala Gln Leu Ile Asp Val Asp Glu Lys Asn  
 65 70 75 80  
 Gln Met Met Thr Thr Asn Val Trp Val Lys Gln Glu Trp His Asp Tyr  
 85 90 95  
 Lys Leu Arg Trp Asp Pro Ala Asp Tyr Glu Asn Val Thr Ser Ile Arg  
 100 105 110  
 Ile Pro Ser Glu Leu Ile Trp Arg Pro Asp Ile Ala Leu Tyr Asn Asn  
 115 120 125  
 Ala Asp Gly Asp Phe Ala Ala Thr His Leu Thr Lys Ala His Leu Phe  
 130 135 140  
 His Asp Gly Arg Val Gln Arg Thr Pro Pro Ala Ile Tyr Lys Ser Ser  
 145 150 155 160  
 Cys Ser Ile Asp Val Thr Phe Phe Pro Phe Asp Gln Gln Asn Cys Thr  
 165 170 175  
 Met Lys Phe Gly Ser Trp Thr Tyr Asp Lys Ala Lys Ile Asp Leu Val  
 180 185 190

Asn	Met	His	Ser	Arg	Val	Asp	Gln	Leu	Asp	Phe	Trp	Glu	Ser	Gly	Glu		
	195						200					205					
Trp	Leu	Ile	Ser	Asp	Ala	Val	Gly	Thr	Tyr	Asn	Thr	Arg	Lys	Tyr	Glu		
	210					215					220						
Cys	Cys	Ala	Glu	Ile	Tyr	Pro	Asp	Ile	Thr	Tyr	Ala	Tyr	Ala	Ile	Arg		
225					230					235					240		
Arg	Leu	Pro	Leu	Phe	Tyr	Thr	Ile	Asn	Leu	Ile	Ile	Pro	Trp	Leu	Leu		
				245					250					255			
Ile	Ser	Cys	Leu	Thr	Ala	Leu	Val	Phe	Tyr	Leu	Pro	Ser	Glu	Cys	Gly		
			260					265					270				
Glu	Lys	Ile	Thr	Leu	Cys	Ile	Ser	Val	Leu	Leu	Ser	Leu	Thr	Val	Phe		
	275						280					285					
Leu	Leu	Leu	Ile	Thr	Glu	Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Ser	Leu	Val	Ile	Pro		
	290					295					300						
Leu	Ile	Gly	Glu	Tyr	Leu	Leu	Phe	Thr	Met	Ile	Phe	Val	Thr	Leu	Ser		
305					310					315					320		
Ile	Ala	Ile	Thr	Val	Phe	Val	Leu	Asn	Val	His	His	Arg	Ser	Pro	Arg		
				325					330					335			
Thr	His	Thr	Met	Pro	Thr	Trp	Val	Arg	Arg	Val	Phe	Leu	Asp	Ile	Val		
			340					345					350				
Pro	Arg	Leu	Leu	Leu	Met	Lys	Arg	Pro	Ser	Val	Val	Lys	Asp	Asn	Cys		
		355					360					365					
Arg	Arg	Leu	Ile	Glu	Ser	Met	His	Lys	Met	Ala	Ser	Ala	Pro	Arg	Phe		
	370					375					380						
Trp	Pro	Glu	Pro	Glu	Gly	Glu	Pro	Pro	Ala	Thr	Ser	Gly	Thr	Gln	Ser		
385					390					395				400			
Leu	His	Pro	Pro	Ser	Pro	Ser	Phe	Cys	Val	Pro	Leu	Asp	Val	Pro	Ala		
				405					410					415			
Glu	Pro	Gly	Pro	Ser	Cys	Lys	Ser	Pro	Ser	Asp	Gln	Leu	Pro	Pro	Gln		
			420					425					430				
Gln	Pro	Leu	Glu	Ala	Glu	Lys	Ala	Ser	Pro	His	Pro	Ser	Pro	Gly	Pro		
		435					440					445					
Cys	Arg	Pro	Pro	His	Gly	Thr	Gln	Ala	Pro	Gly	Leu	Ala	Lys	Ala	Arg		
	450					455					460						
Ser	Leu	Ser	Val	Gln	His	Met	Ser	Ser	Pro	Gly	Glu	Ala	Val	Glu	Gly		
465					470					475				480			
Gly	Val	Arg	Cys	Arg	Ser	Arg	Ser	Ile	Gln	Tyr	Cys	Val	Pro	Arg	Asp		
				485					490					495			

Asp Ala Ala Pro Glu Ala Asp Gly Gln Ala Ala Gly Ala Leu Ala Ser  
                     500                    505                    510  
 Arg Asn Ser His Ser Ala Glu Leu Pro Pro Pro Asp Gln Pro Ser Pro  
                     515                    520                    525  
 Cys Lys Cys Thr Cys Lys Lys Glu Pro Ser Ser Val Ser Pro Ser Ala  
                     530                    535                    540  
 Thr Val Lys Thr Arg Ser Thr Lys Ala Pro Pro Pro His Leu Pro Leu  
                     545                    550                    555                    560  
 Ser Pro Ala Leu Ser Arg Ala Val Glu Gly Val Gln Tyr Ile Ala Asp  
                     565                    570                    575  
 His Leu Lys Ala Glu Asp Thr Asp Phe Ser Val Lys Glu Asp Trp Lys  
                     580                    585                    590  
 Tyr Val Ala Met Val Ile Asp Arg Ile Phe Leu Trp Met Phe Ile Ile  
                     595                    600                    605  
 Val Cys Leu Leu Gly Thr Val Gly Leu Phe Leu Pro Pro Trp Leu Ala  
                     610                    615                    620  
 Gly Met Ile  
 625

配列番号：7

配列の長さ：1876

配列の型：核酸

鎖の数：両者

トポロジー：両者

配列の種類：cDNA

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：73...1581

他の情報：生成物 =  $\alpha$  サブユニット

配列

GGCCGCAGGC GCAGGCCCGG GCGACAGCCG AGACGTGGAC CGCGCCGGCT CGCTGCAGCT	60
CGGGGACTCA ACATGCGCTG CTCGCCGCGA GCGCTCTGGC TCGCGCTCGC CGCCTCGCTC	120
CTGCACGTCT CCCTCCAAGC CGACTTCCAG AGCAAGCTTT ACAAGGAGCT GGTCAAGAAC	180
TACAATCCCT TGGAGAGGCC CGTGGCGAAT GACTCGCAAC CACTCACCCT CTACTTCTCC	240

CTGAGCCTCC TGCAGATCAT GGACGTGGAT GAGAAGAACC AAGTTTTAAC CACGAACATT	300
TGGCTGCAAA TGTCTTGGAC AGATCACTAT TTACAGTGGG ATGTCTCACA ATATCCAGCG	360
GTGAAGACTG TTCGTTTCCC AGATGGCCAG ATTTGGAAAC CAGACATTCT TCTCTATAAC	420
AGTGCTGATG ASCGCTTTGA CGCCACATTG CACACTAACC TGTGGTGAA TTCCTCTGGG	480
CATTGCCAGT ACCTGCCCTCC AGGCATATTC AACAGTTCCCT GCTACATCGA TGTACGCTCG	540
TTTCCCTTTG ATGTGCAGCA CTGCAAACTG AAGTTTGGGT CCTGGTCTTA CGGAGGCTGG	600
TCCTTGGATC TGCAGATGCA GGAGGCAGAT ATCAGTGGCT ATATCCCCAA TGCAGAATGG	660
GACCTAGTGG GAATCCCCGG CAAGAGGACT GAAAGGTTCT ATCAGTGGTG CAAAGAGCCC	720
TACCCCGATC TCACCTTCAC AGTGACCATG CGGCGCAGGA CGCTCTACTA TGGCCTCAAC	780
CTGCTGATCC CCTGTGTGCT CATCTCCGCC CTGCGCCTGC TGGTGTTCCT GCTTCCTGCA	840
GATTCCGGGG AGAAGATTTC CCTGGGGATA ACAGTCTTAC TCTCTCTTAC CGTCTTCATG	900
CTGCTCGTGG CTGAGATCAT GCGCGCAACA TCCGATTGGG TACCATTGAT AGCCCACTAC	960
TTCCGCAGCA CCATCATCAT CGTGGGCTC TCGGTGGTGG TGACGGTGAT CGTGTGAC	1020
TACCACCACC ACGACCCCGA CGGCGGCAAG ATGCCCAAGT CGACCAGACT CATCCTTCTG	1080
AACTGGTGGC CGTCTTCCT SCGAATGAAG AGGCGCGGGG AGGACAAGGT GCGCCCGGCC	1140
TGCCAGCACA AGCAGCGGCG CTGCAGGCTG GCCAGTGTGG AGATGAGCGC CGTGGCGCGG	1200
CGGCGCGGCA GCAACGGGAA CCTGCTGTAC ATCCGCTTCC GCGCCCTGGA CGGCGTGAC	1260
TCTCTCCCGA CCCCCGACTC TGGCGTAGTG TGTTGGCGCA TGGCCTGCTC CGCGACGCAC	1320
GATGAGCACC TCCTGCACGG CGGGCAACCC CCGGAGGGG ACCCGGACTT GGCCAAGATC	1380
CTGGAGGAGG TCCGCTACAT TGGCAATCGC TTCCGCTGCC AGGACGAAAC CGAGCGGCTC	1440
TGCAGCGAGT GGAAGTTGCG CGCCTGTGTG CTGCACCGCC TGTCCCTCAT GGCCTTCTCG	1500
GTCTTCACCA TCATCTGCAC CATCGGCATC CTGATGTCGG CTCCCAACTT CGTGGAGGCC	1560
GTGTGCAAAG ACTTTGGGTA ACCACGCCTG GTTCTGTACA TGTGAAAAC TCACAGATGC	1620
GCAAGGGCTT TGGCTTGGCG AGATTTGGGG GTCTAATCC ACCACAGCAT TACACGCCAC	1680
AACTCCAGTG TTCGCTTCTG CGTGTCAGTC CTCTTGCTTA CGGTTTCTTT GTTACTTTAG	1740
GTAGTAGAAT CTCAGCACTT TGTTCATAT TCTCAGATGG GCTGATAGAT ATCCTTGGCA	1800
CATCGGTACC ATCGGTACG AGGGCCACTG AGTAGTCATT TTGCCCATTA GCGCACTGCC	1860
TGAAAGCCC TTCGGA	1876

配列番号：8

配列の長さ：502

配列の型：アミノ酸

トポロジー：不明

配列の種類：タンパク質

配列

Met	Arg	Cys	Ser	Pro	Gly	Gly	Val	Trp	Leu	Ala	Leu	Ala	Ala	Ser	Leu	1	5	10	15
Leu	His	Val	Ser	Leu	Gln	Gly	Glu	Phe	Gln	Arg	Lys	Leu	Tyr	Lys	Glu	20	25	30	
Leu	Val	Lys	Asn	Tyr	Asn	Pro	Leu	Glu	Arg	Pro	Val	Ala	Asn	Asp	Ser	35	40	45	
Gln	Pro	Leu	Thr	Val	Tyr	Phe	Ser	Leu	Ser	Leu	Leu	Gln	Ile	Met	Asp	50	55	60	
Val	Asp	Glu	Lys	Asn	Gln	Val	Leu	Thr	Thr	Asn	Ile	Trp	Leu	Gln	Met	65	70	75	80
Ser	Trp	Thr	Asp	His	Tyr	Leu	Gln	Trp	Asn	Val	Ser	Glu	Tyr	Pro	Gly	85	90	95	
Val	Lys	Thr	Val	Arg	Phe	Pro	Asp	Gly	Gln	Ile	Trp	Lys	Pro	Asp	Ile	100	105	110	
Leu	Leu	Tyr	Asn	Ser	Ala	Asp	Glu	Arg	Phe	Asp	Ala	Thr	Phe	His	Thr	115	120	125	
Asn	Val	Leu	Val	Asn	Ser	Ser	Gly	His	Cys	Gln	Tyr	Leu	Pro	Pro	Gly	130	135	140	
Ile	Phe	Lys	Ser	Ser	Cys	Tyr	Ile	Asp	Val	Arg	Trp	Phe	Pro	Phe	Asp	145	150	155	160
Val	Gln	His	Cys	Lys	Leu	Lys	Phe	Gly	Ser	Trp	Ser	Tyr	Gly	Gly	Trp	165	170	175	
Ser	Leu	Asp	Leu	Gln	Met	Gln	Glu	Ala	Asp	Ile	Ser	Gly	Tyr	Ile	Pro	180	185	190	
Asn	Gly	Glu	Trp	Asp	Leu	Val	Gly	Ile	Pro	Gly	Lys	Arg	Ser	Glu	Arg	195	200	205	
Phe	Tyr	Glu	Cys	Cys	Lys	Glu	Pro	Tyr	Pro	Asp	Val	Thr	Phe	Thr	Val	210	215	220	

Thr	Met	Arg	Arg	Arg	Thr	Leu	Tyr	Tyr	Gly	Leu	Asn	Leu	Leu	Ile	Pro	225	230	235	240
Cys	Val	Leu	Ile	Ser	Ala	Leu	Ala	Leu	Leu	Val	Phe	Leu	Leu	Pro	Ala	245	250	255	
Asp	Ser	Gly	Glu	Lys	Ile	Ser	Leu	Gly	Ile	Thr	Val	Leu	Leu	Ser	Leu	260	265	270	
Thr	Val	Phe	Met	Leu	Leu	Val	Ala	Glu	Ile	Met	Pro	Ala	Thr	Ser	Asp	275	280	285	
Ser	Val	Pro	Leu	Ile	Ala	Gln	Tyr	Phe	Ala	Ser	Thr	Met	Ile	Ile	Val	290	295	300	
Gly	Leu	Ser	Val	Val	Val	Thr	Val	Ile	Val	Leu	Gln	Tyr	His	His	His	305	310	315	320
Asp	Pro	Asp	Gly	Gly	Lys	Met	Pro	Lys	Trp	Thr	Arg	Val	Ile	Leu	Leu	325	330	335	
Asn	Trp	Cys	Ala	Trp	Phe	Leu	Arg	Met	Lys	Arg	Pro	Gly	Glu	Asp	Lys	340	345	350	
Val	Arg	Pro	Ala	Cys	Gln	His	Lys	Gln	Arg	Arg	Cys	Ser	Leu	Ala	Ser	355	360	365	
Val	Glu	Met	Ser	Ala	Val	Ala	Pro	Pro	Pro	Ala	Ser	Asn	Gly	Asn	Leu	370	375	380	
Leu	Tyr	Ile	Gly	Phe	Arg	Gly	Leu	Asp	Gly	Val	His	Cys	Val	Pro	Thr	385	390	395	400
Pro	Asp	Ser	Gly	Val	Val	Cys	Gly	Arg	Met	Ala	Cys	Ser	Pro	Thr	His	405	410	415	
Asp	Glu	His	Leu	Leu	His	Gly	Gly	Gln	Pro	Pro	Glu	Gly	Asp	Pro	Asp	420	425	430	
Leu	Ala	Lys	Ile	Leu	Glu	Glu	Val	Arg	Tyr	Ile	Ala	Asn	Arg	Phe	Arg	435	440	445	
Cys	Gln	Asp	Glu	Ser	Glu	Ala	Val	Cys	Ser	Glu	Trp	Lys	Phe	Ala	Ala	450	455	460	
Cys	Val	Val	Asp	Arg	Leu	Cys	Leu	Met	Ala	Phe	Ser	Val	Phe	Thr	Ile	465	470	475	480
Ile	Cys	Thr	Ile	Gly	Ile	Leu	Met	Ser	Ala	Pro	Asn	Phe	Val	Glu	Ala	485	490	495	
Val	Ser	Lys	Asp	Phe	Ala											500			

配列番号：9

配列の長さ：2448

配列の型：核酸

鎖の数：両者

トポロジー：両者

配列の種類：cDNA

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：265...1773

他の情報：生成物 =  $\beta_2$ サブユニット

配列

CTCCTCCCC TCACCGTCCC AATTGTATTC CCTGGAAGAG CAGCCGGAAA AGCCTCCCC	60
TGCTCATACC AGGATAGGGA AGAAGCTGGT TTCTCCTCGC ACCCGGCTCC CTGAGGCCCA	120
CGAACCACCG CGCGGGCCGG CACCACCTGG ACCCAGCTCC AGGCGGGCGC GGCTTCAGCA	180
CCACGGACAG CGCCCCACCC GCGGCCCTCC CCGCGCGGGC GCGCTCCAGC GGCTGTAGCC	240
GAGGCAGCGA GCTATGCCCG CGGCATGCCC CGGCCCTGCC GCGCCCTGCC GCTGCTCCTT	300
GCCTTCGGCC TCCTCCGGCT GTGCTCAGGG GTGTGGGGTA CGGATACAGA GGAGCGGCTG	360
GTGGAGCATC TCCTGGATCC TTCCCGCTAC AACAAGCTTA TCCGCCCAGC CACCAATGCC	420
TCTGAGCTGG TGACAGTACA GCTTATGGTG TCACTGGCCC ACCTCATCAG TGTGCATGAG	480
CGGGAGCAGA TCATGACCAC CAATGTCTGG CTGACCCAGG AGTGGGAAGA TTATCGCCTC	540
ACCTGGAAGC CTGAAGAGTT TGACAACATG AAGAAAGTTC GGCTCCCTTC CAAACACATC	600
TGGCTCCAC ATGTGGTCCT GTACAACAAT GCTGACGGCA TGTACGAGGT GTCCTTCTAT	660
TCCAATGCCC TGGTCTCCTA TGATGCCACC ATCTTCTGCC TGGCGCCTGC CATCTACAAG	720
AGCGCATGCA AGATTGAAGT AAAGCACTTC CCATTTGACC AGCAGAACTG CACCATGAAG	780
TTCEGTTTCG GGACCTACGA CCGCACAGAG ATCGACTTGG TGCTGAAGAG TGAGGTGCCC	840
AGCCTGGAGG ACTTCACACC TAGTGGTGAG TGGGACATCG TGGCGCTGCC CGCCCCCGGC	900
AACGAGAACC CGGACGACTC TAGGTACGTG GACATCACCT ATGACTTCAT CATTCGCCCC	960
AAGCCGCTCT TCTACACCAT CAACCTCATC ATCCGCTGTC TGCTCATCAC CTCGCTAGCC	1020

ATCCTTGTCT TCTACCTGCC ATCCGACTGT GGCGAGAAGA TGACCTTGTG CATCTCACTC	1080
CTGCTGGCGC TCACGGTCTT CCTGCTGCTC ATCTCCAAGA TCGTGCCTCC CACCTCCCTC	1140
GACGTGCCGC TCGTGGGCAA GTACCTCATG TTCACCATGG TGCTTGTCAC CTTCTCCATC	1200
GTCACCAGCG TGTGGTGCT CAACGTGCAC CACCGCTCGC CCACCACGCA CACCATGGCG	1260
CCCTGGGTGA AGGTGCTCTT CCTGGAGAAG CTGCCGGCGC TGCTCTTCAT GCAGCAGCCA	1320
CGCCATCATT GCGCCCGTCA GCGCCTGCGC CTGCCGGGAC GCCAGCGTGA GCGCGAGGGC	1380
GCTGGAGCCC TCTTCTTCGG CGAAGCCCGA GGGGCGGACT CCTGCACGTG CTTCTGTAAC	1440
CGCGCGTCCG TGCAGCGGTT GCGCGGGGCC TTCGGGGGTG AGCCTGCACC ACTCGCGGGC	1500
CGCGGGCCCT CAGGGGAGCC GTGTGGCTGT GGCCTCGGG AGCGGGTGGA GGGCGTGGC	1560
TTCATCGCAG ACCACATGCC CAGCGAGGAC GATGACCAGA GCGTGAGTGA GGA CTGGAAG	1620
TACGTGCGCA TGGTGATCGA CCGCTCTTC CTCTGGATCT TTGTCTTTGT CTGTGTCTTT	1680
GGCACCATCG GCATGTTCTT GCAGCCTCTC TTCGAGAACT ACACCACCAC CACCTTCCTC	1740
CATCAGACC ACTCAGCCCC CAGCTCCAAG TGAGGCCCTT CCTCATCTCC ATGCTCTTTC	1800
ACCCTGCCAC CCTCTGTGC ACAGTACTGT TGGGIGGAGG ATGCACGAGT GAGCTACCAG	1860
GAAGAGGGGC GCTGCCCGCA CAGATCCATC CTTTGTCTTC ATCTGGAGTC CCTCCTCCCC	1920
CAGCCCTCCA TCCACACACA GCAGCTCGAA CCTGGAGGCT GGACCAACTG CTTTCTTTTG	1980
GCTGCTCTCC ATCTCTTGTA CCAGCCGAGG CAATAGTGTT GAGGAGGGGA GCAAGGCTGC	2040
TAAGTGGAAG ACAGAGATGG CAGAGCCATC CACCCTGAGG AGTGACGGGC AAGGGGCCAG	2100
GAAGGGGACA GGATTGTCTG CTGCCTCCAA GTCATGGGAG AAGAGGGGTA TAGGACAAGG	2160
GGTGGAAGCC CAGGAGCTCA CACCGCACCG GCCTGGCCTC ACACAATCGT AGCTCTGAAG	2220
GGAGGGGAAG AGAGAGGCCT GGGTGTGACC TGACACCTGC CGCTGCTTGA GTGGACAGCA	2280
GCTGGACTGG GTGGGCCCCA CAGTGGTCAG CGATTCTGC CAAGTAGGGT TTAGCCGGGC	2340
CCCATGCTCA CAGACCCCTG GGGGAGGCTT CCAGCTCAGT CGGACAGCCC CTTGCTTCTA	2400
AGGGATGCAG AGACCTGCTC CAGATCCTCT TTCCCACTG AAGAATTC	2448

配列番号：10

配列の長さ：502

配列の型：アミノ酸

トポロジー：不明



配列の種類：タンパク質

配列

```

Met Ala Arg Arg Cys Gly Pro Val Ala Leu Leu Leu Gly Phe Gly Leu
 1          5          10          15

Leu Arg Leu Cys Ser Gly Val Trp Gly Thr Asp Thr Glu Glu Arg Leu
          20          25          30

Val Glu His Leu Leu Asp Pro Ser Arg Tyr Asn Lys Leu Ile Arg Pro
          35          40          45

Ala Thr Asn Gly Ser Glu Leu Val Thr Val Gln Leu Met Val Ser Leu
          50          55          60

Ala Gln Leu Ile Ser Val His Glu Arg Glu Gln Ile Met Thr Thr Asn
65          70          75          80

Val Trp Leu Thr Gln Glu Trp Glu Asp Tyr Arg Leu Thr Trp Lys Pro
          85          90          95

Glu Glu Phe Asp Asn Met Lys Lys Val Arg Leu Pro Ser Lys His Ile
          100          105          110

Trp Leu Pro Asp Val Val Leu Tyr Asn Asn Ala Asp Gly Met Tyr Glu
          115          120          125

Val Ser Phe Tyr Ser Asn Ala Val Val Ser Tyr Asp Gly Ser Ile Phe
          130          135          140

Trp Leu Pro Pro Ala Ile Tyr Lys Ser Ala Cys Lys Ile Glu Val Lys
145          150          155          160

His Phe Pro Phe Asp Gln Gln Asn Cys Thr Met Lys Phe Arg Ser Trp
          165          170          175

Thr Tyr Asp Arg Thr Glu Ile Asp Leu Val Leu Lys Ser Glu Val Ala
          180          185          190

Ser Leu Asp Asp Phe Thr Pro Ser Gly Glu Trp Asp Ile Val Ala Leu
          195          200          205

Pro Gly Arg Arg Asn Glu Asn Pro Asp Asp Ser Thr Tyr Val Asp Ile
210          215          220

```

Thr	Tyr	Asp	Phe	Ile	Ile	Arg	Arg	Lys	Pro	Leu	Phe	Tyr	Thr	Ile	Asn
225					230					235					240
Leu	Ile	Ile	Pro	Cys	Val	Leu	Ile	Thr	Ser	Leu	Ala	Ile	Leu	Val	Phe
				245					250					255	
Tyr	Leu	Pro	Ser	Asp	Cys	Gly	Glu	Lys	Met	Thr	Leu	Cys	Ile	Ser	Val
			260					265					270		
Leu	Leu	Ala	Leu	Thr	Val	Phe	Leu	Leu	Leu	Ile	Ser	Lys	Ile	Val	Pro
		275					280					285			
Pro	Thr	Ser	Leu	Asp	Val	Pro	Leu	Val	Gly	Lys	Tyr	Leu	Met	Phe	Thr
	290					295					300				
Met	Val	Leu	Val	Thr	Phe	Ser	Ile	Val	Thr	Ser	Val	Cys	Val	Leu	Asn
305					310					315					320
Val	His	His	Arg	Ser	Pro	Thr	Thr	His	Thr	Met	Ala	Pro	Trp	Val	Lys
				325					330					335	
Val	Val	Phe	Leu	Glu	Lys	Leu	Pro	Ala	Leu	Leu	Phe	Met	Gln	Gln	Pro
			340					345					350		
Arg	His	His	Cys	Ala	Arg	Gln	Arg	Leu	Arg	Leu	Arg	Arg	Arg	Gln	Arg
		355					360					365			
Glu	Arg	Glu	Gly	Ala	Gly	Ala	Leu	Phe	Phe	Arg	Glu	Ala	Pro	Gly	Ala
	370					375					380				
Asp	Ser	Cys	Thr	Cys	Phe	Val	Asn	Arg	Ala	Ser	Val	Gln	Gly	Leu	Ala
385					390					395					400
Gly	Ala	Phe	Gly	Ala	Glu	Pro	Ala	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Gly	Arg	Ser
				405					410					415	
Gly	Glu	Pro	Cys	Gly	Cys	Gly	Leu	Arg	Glu	Ala	Val	Asp	Gly	Val	Arg
			420					425					430		
Phe	Ile	Ala	Asp	His	Met	Arg	Ser	Glu	Asp	Asp	Asp	Gln	Ser	Val	Ser
		435					440					445			
Glu	Asp	Trp	Lys	Tyr	Val	Ala	Met	Val	Ile	Asp	Arg	Leu	Phe	Leu	Trp
	450					455					460				
Ile	Phe	Val	Phe	Val	Cys	Val	Phe	Gly	Thr	Ile	Gly	Met	Phe	Leu	Gln
465					470					475					480
Pro	Leu	Phe	Gln	Asn	Tyr	Thr	Thr	Thr	Thr	Phe	Leu	His	Ser	Asp	His
				485					490					495	
Ser	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys										
			500												

配列番号：11

配列の長さ：1915

配列の型：核酸

鎖の数：両者

トポロジー：両者

配列の種類：cDNA

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：87..1583

他の情報：生成物 =  $\beta_4$ サブユニット

配列

CCGGCGCTCA CTGGACCGCG CGGCTCACGG GTGCCCTGTG ACCCCACAGC GGAGCTCGCG	60
GCGGCTGCCA GCGGGCCCCG CCGGCCATGA GGCGCGCGCC TTCCCTGGTC CTTTCTTCC	120
TGCTCGCCCT TTGCGGGCGG GGGAACTGCC GCGTGGCAA TCGGAGGAA AAGCTGATGG	180
AGGACCTTCT GAACAAAACC CGTTAGAATA ACCTGATCCG CCCAGCCACC AGCTCCTCAC	240
AGCTCATCTC CATCAACCTC CAGCTCTCCC TGGCCACCT TATCAGCGTG AATGAGCGAG	300
AGCAGATCAT CACCACCAAT GTCTGGCTGA AACAGGAATG GACTGATTAC CGCCTGACCT	360
GGAACAGCTC CCGCTACGAG GGTGTGAACA TCCTGAGGAT CCCTGCAAAG CGCATCTGCT	420
TGCCTGACAT CGTGCTTTAC AACAAACGGG ACCGCACCTA TGAGCTCTCT CTCTACACCA	480
ACTTGATACT CCGGTCCAAC GGCAGCGTCC TGTGGCTGCC CGCTGCCATC TACAAGAGCG	540
CCTGCAAGAT TGAGGTGAAG TACTTTCCCT TCGACCAGCA GAACTGCACC CTCAACTTCC	600
GCTCCTGGAC CTATGACCAC ACGGAGATAG ACATCGTCCT CATGACGCCC ACAGCCAGCA	660
TGGATCACTT TACTCCCACT GGTGAGTGGG ACATAGTGGC CCTCCCAGGG AGAAGGACAG	720
TGAACCCACA AGACCCGAGC TACGTGGAGG TGACTTACGA CTTATCATC AAGGCAAGC	780
CTCTGTTCTA CACCATCAAC CTCATCATCC CCTGCGTGCT CACCACCTTG CTGCCCATCC	840
TGCTCTTCTA CCTGCCATCC GACTGCGGCG AGAACATCAC ACTGTGCATC TCACTGCTGC	900
TGGCACTGAC ATTCTTCCTC CTGCTCATCT CCAAGATCGT CCCACCCACC TCCCTCGATG	960
TGCCTCTCAT CGGCAAGTAC CTCATGTICA CCATGGTGCT GGTACCTTC TCCATCCTCA	1020

```

CCAGCCTCTG TCTGCTCAAT GTCCACCACC GCTCGCCCAG CACCCACACC ATGCCACCCT 1080
GGGTCAAGCG CTGCTTCCTG CACAAGCTGC CTACCTTCCT CTTCAATGAAG CGCCCTGGCC 1140
CCGACAGCAG CCCCCGCCAG GCGTTCCCGC CCAGCAAGTC ATGCGTGACC AAGCCCGAGG 1200
CCACCGCCAC CTCACCCAGC CGCTCCAACT TCTATGGGAA CTCCATGTAC TTTGTGAACC 1260
CCCCCTCTGC AGCTTCCAAG TCTCCAGCCC GCTCTAGCCG GGTGGCTATC CCCAGGGATT 1320
TCTGGCTGGG GTCCCTCTGG AGCTTCCGAC AGCATGTCCA GGAGGCATTA GAAGGTGICA 1380
GCTTCATGGC CCAGCACATG AAGAATGAGG ATGAAGACCA GAGTGTCCCT GAGCACTCGA 1440
ACTACGTGGC TATGGTGGTG GACCGGCTGT TCCTGTGGGT GTTCATGTTT GTGTGGCTCC 1500
TGGGCACTGT GGGGCTCTTC CTGCGGCCCC TCTCCAGAC CCATGCAGCT TCTGAGGGGC 1560
CCTACGCTCC CCACCGTGAC TGAGGCCCCC CTGGGTGTG GGGTGAGAGG ATGTGAGTGG 1620
CGGGGTGGGC ACTTTGCTGC TTCTTTCTGC GTTGIGGCCG ATGAGGCCCT AAGTAAATAT 1680
GTGAGCATTG GCCATCAACC CCATCAAACC AGCCACAGCC GTGGAACAGG GAAGGATGGG 1740
GGCCTGGCCT GTCCCTCTCTG AATGCCCTTG AGGGATCCCA CGAAGCCCCA GTAGGAGGGA 1800
GCTTCAGACA GTTCAATICT GGCCTGTCTT CCTTCCTTGC ACCGGGCAAT GCGCATAAAG 1860
ATGACTTCGT AGCAGCACCT ACTATGCTTC AGGCATGCTG CCGGCCTGCC TCTCC 1915

```

配列番号：12

配列の長さ：498

配列の型：アミノ酸

トポロジー：不明

配列の種類：タンパク質

配列

```

Met Arg Arg Ala Pro Ser Leu Val Leu Phe Phe Leu Val Ala Leu Cys
1          5          10          15
Gly Arg Gly Asn Cys Arg Val Ala Asn Ala Glu Glu Lys Leu Met Asp
20          25          30
Asp Leu Leu Asn Lys Thr Arg Tyr Asn Asn Leu Ile Arg Pro Ala Thr
35          40          45
Ser Ser Ser Gln Leu Ile Ser Ile Lys Leu Gln Leu Ser Leu Ala Gln
50          55          60
Leu Ile Ser Val Asn Glu Arg Glu Gln Ile Met Thr Thr Asn Val Trp
65          70          75          80

```

Leu	Lys	Gln	Glu	Trp	Thr	Asp	Tyr	Arg	Leu	Thr	Trp	Asn	Ser	Ser	Arg
				85					90					95	
Tyr	Glu	Gly	Val	Asn	Ile	Leu	Arg	Ile	Pro	Ala	Lys	Arg	Ile	Trp	Leu
			100					105					110		
Pro	Asp	Ile	Val	Leu	Tyr	Asn	Asn	Ala	Asp	Gly	Thr	Tyr	Glu	Val	Ser
		115					120					125			
Val	Tyr	Thr	Asn	Leu	Ile	Val	Arg	Ser	Asn	Gly	Ser	Val	Leu	Trp	Leu
	130					135					140				
Pro	Pro	Ala	Ile	Tyr	Lys	Ser	Ala	Cys	Lys	Ile	Glu	Val	Lys	Tyr	Phe
145					150					155					160
Pro	Phe	Asp	Gln	Gln	Asn	Cys	Thr	Leu	Lys	Phe	Arg	Ser	Trp	Thr	Tyr
			165					170						175	
Asp	His	Thr	Glu	Ile	Asp	Met	Val	Leu	Met	Thr	Pro	Thr	Ala	Ser	Met
		180						185					190		
Asp	Asp	Phe	Thr	Pro	Ser	Gly	Glu	Trp	Asp	Ile	Val	Ala	Leu	Pro	Gly
		195					200					205			
Arg	Arg	Thr	Val	Asn	Pro	Gln	Asp	Pro	Ser	Tyr	Val	Asp	Val	Thr	Tyr
	210					215					220				
Asp	Phe	Ile	Ile	Lys	Arg	Lys	Pro	Leu	Phe	Tyr	Thr	Ile	Asn	Leu	Ile
225					230					235					240
Ile	Pro	Cys	Val	Leu	Thr	Thr	Leu	Leu	Ala	Ile	Leu	Val	Phe	Tyr	Leu
			245						250					255	
Pro	Ser	Asp	Cys	Gly	Glu	Lys	Met	Thr	Leu	Cys	Ile	Ser	Val	Leu	Leu
		260					265						270		
Ala	Leu	Thr	Phe	Phe	Leu	Leu	Leu	Ile	Ser	Lys	Ile	Val	Pro	Pro	Thr
		275					280					285			
Ser	Leu	Asp	Val	Pro	Leu	Ile	Gly	Lys	Tyr	Leu	Met	Phe	Thr	Met	Val
	290					295					300				
Leu	Val	Thr	Phe	Ser	Ile	Val	Thr	Ser	Val	Cys	Val	Leu	Asn	Val	His
305					310					315					320
His	Arg	Ser	Pro	Ser	Thr	His	Thr	Met	Ala	Pro	Trp	Val	Lys	Arg	Cys
			325						330					335	
Phe	Leu	His	Lys	Leu	Pro	Thr	Phe	Leu	Phe	Met	Lys	Arg	Pro	Gly	Pro
			340					345					350		
Asp	Ser	Ser	Pro	Ala	Arg	Ala	Phe	Pro	Pro	Ser	Lys	Ser	Cys	Val	Thr
		355					360					365			
Lys	Pro	Glu	Ala	Thr	Ala	Thr	Ser	Thr	Ser	Pro	Ser	Asn	Phe	Tyr	Gly
	370					375					380				

Asn Ser Met Tyr Phe Val Asn Pro Ala Ser Ala Ala Ser Lys Ser Pro  
 385 390 395 400

Ala Gly Ser Thr Pro Val Ala Ile Pro Arg Asp Phe Trp Leu Arg Ser  
 405 410 415

Ser Gly Arg Phe Arg Gln Asp Val Gln Glu Ala Leu Glu Gly Val Ser  
 420 425 430

Phe Ile Ala Gln His Met Lys Asn Asp Asp Glu Asp Gln Ser Val Val  
 435 440 445

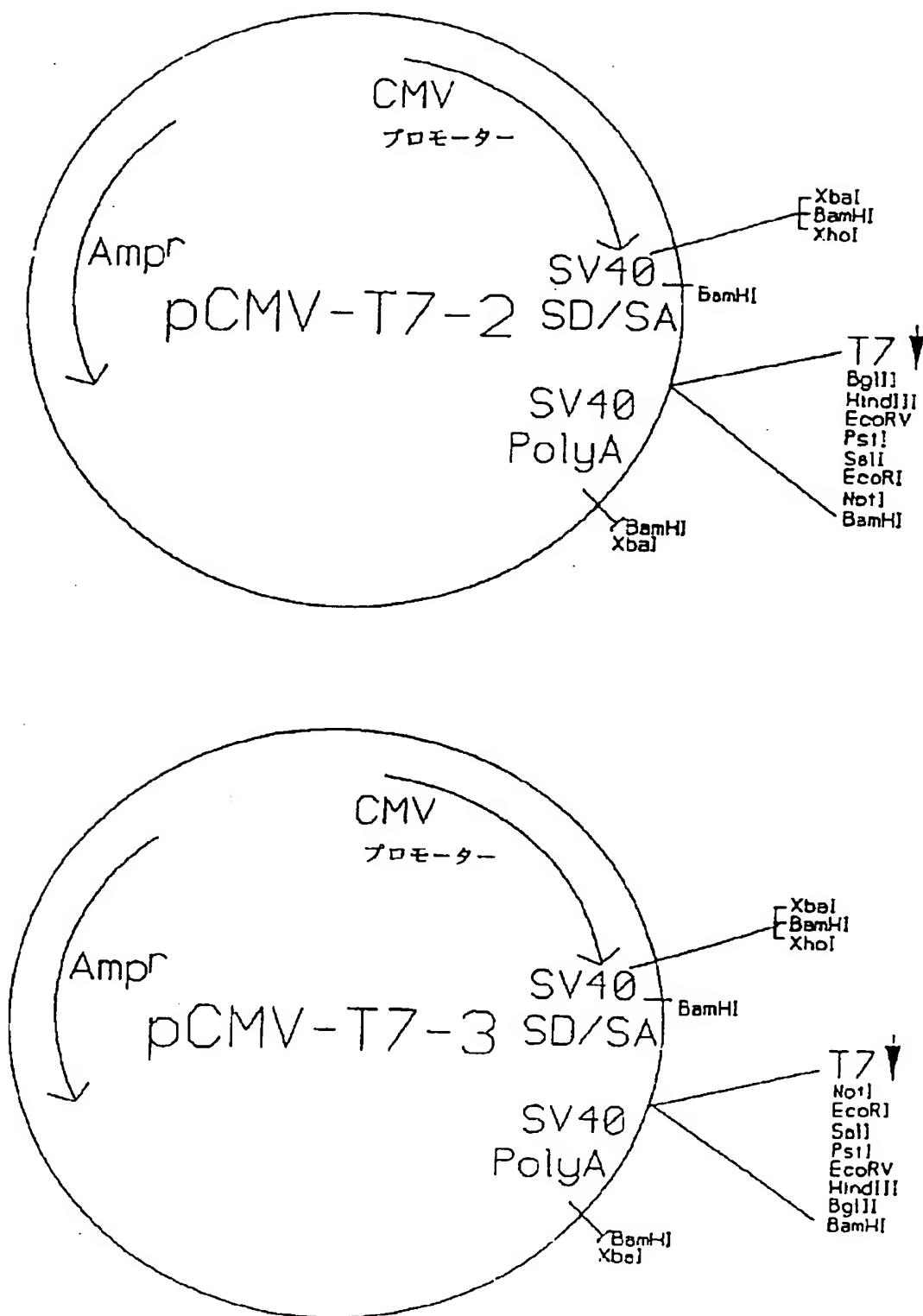
Glu Asp Trp Lys Tyr Val Ala Met Val Val Asp Arg Leu Phe Leu Trp  
 450 455 460

Val Phe Met Phe Val Cys Val Leu Gly Thr Val Gly Leu Phe Leu Pro  
 465 470 475 480

Pro Leu Phe Gln Thr His Ala Ala Ser Glu Gly Pro Tyr Ala Ala Gln  
 485 490 495

Arg Asp

【図1】



【手続補正書】特許法第184条の8

【提出日】1995年3月3日

【補正内容】

請求の範囲

1. ヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体の $\alpha_4$ または $\alpha_7$ サブユニットをコードするヌクレオチドの配列からなる単離されたDNA.
2. サブユニットは $\alpha_4$ サブユニットである「請求項1」のDNA.
3. DNAは、配列番号：6に掲げたアミノ酸配列もしくはクローンHnAChR $\alpha_4$ . 2 (ATCC受入番号69239) によってコードされるアミノ酸配列をコードするか、またはDNAの5'ヌクレオチドがクローンHnAChR $\alpha_4$ . 1 (ATCC受入番号69152) によってコードされるアミノ酸配列をコードする「請求項2」のDNA.
4. DNAは、配列番号：5に掲げた実質的に全コード配列(ヌクレオチド184-2067)に高い緊縮条件でもしくは、クローンHnAChR $\alpha_4$ . 2 (ATCC受入番号69239) の $\alpha_4$ コード挿入体の実質的に全配列に高い緊縮条件でハイブリダイズするか、またはDNAの5'ヌクレオチドがクローンHnAChR $\alpha_4$ . 1 (ATCC受入番号69152) の $\alpha_4$ コード挿入体の配列に高い緊縮条件下にハイブリダイズする「請求項2」のDNA.
5. DNAは、配列番号：5に掲げたヌクレオチド184-2067、もしくはクローンHnAChR $\alpha_4$ . 2 (ATCC受入番号69239) の $\alpha_4$ コード挿入体と実質的に同一のヌクレオチドを有するか、またはDNAの5'ヌクレオチドがクローンHnAChR $\alpha_4$ . 1 (ATCC受入番号69152) の $\alpha_4$ コード挿入体と実質的に同一の配列を有する「請求項2」のDNA.
6. サブユニットは $\alpha_7$ サブユニットである「請求項1」のDNA.
7. DNAのヌクレオチドは、配列番号：8に掲げたアミノ酸配列をコードする「請求項6」のDNA.
8. DNAのヌクレオチドは、配列番号：7に掲げた実質的に全コード配列(ヌクレオチド73-1581)に高い緊縮条件でハイブリダイズする「請求項6」のDNA.



9. DNAのヌクレオチドは、配列番号：7に掲げたヌクレオチド73-1581と実質的に同一のヌクレオチド配列を有する「請求項6」のDNA.
10. ヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体の $\beta_4$ サブユニットをコードするヌクレオチドからなる単離されたDNA.
11. DNAのヌクレオチドは、配列番号：12に掲げたアミノ酸配列をコードする「請求項10」のDNA.
12. DNAのヌクレオチドは、配列番号：11に掲げたヌクレオチド87からヌクレオチド約227までに高い緊縮条件でハイブリダイズする「請求項10」のDNA.
13. DNAのヌクレオチドは、配列番号：11に掲げたヌクレオチド87-1583の配列を有する「請求項10」のDNA.
14. 「請求項1」のDNAの少なくとも1種でトランスフォームされた細胞であって、細菌細胞、真核細胞または両生類卵母細胞である細胞.
15. さらに、ヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体の $\beta$ サブユニットをコードする少なくとも1種のDNAでトランスフォームされた「請求項14」の細胞.
16. さらに、電位依存性カルシウムチャンネルを発現できる特性を有する「請求項15」の細胞.
17.  $\beta$ サブユニットは $\beta_2$ または $\beta_4$ から選択される「請求項15」の細胞.
18.  $\beta$ サブユニットは $\beta_4$ サブユニットである「請求項15」の細胞.
19. 細胞は、DNAによってコードされる1種または2種以上のサブユニットを含有する機能性の神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体を発現する「請求項14」の細胞.
20. 細胞は細菌細胞、真核細胞または両生類卵母細胞であり、「請求項10」のDNAの少なくとも1種でトランスフォームされた細胞.
21. さらに、ヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体の $\alpha$ サブユニットをコードする少なくとも1種のDNAでトランスフォームされた「請求項20」の細胞.

22. さらに、電位依存性カルシウムチャンネルを発現できる特性を有する「請求項21」の細胞。

23.  $\alpha$ サブユニットは、 $\alpha_1$ 、 $\alpha_2$ 、 $\alpha_3$ 、 $\alpha_4$ 、 $\alpha_5$ または $\alpha_7$ から選択される「請求項21」の細胞。

24.  $\alpha$ サブユニットは、 $\alpha_4$ または $\alpha_7$ から選択される「請求項21」の細胞。

25. ヒト $\alpha_3$ およびヒト $\beta_4$ サブユニットをコードするDNAでトランスフォームされる「請求項21」の細胞。

26. DNAによってコードされる1種または2種以上のサブユニットを含有する機能性の神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体を発現する「請求項20」の細胞。

27. ヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体の活性を修飾する化合物を同定する化合物のスクリーニング方法において、その方法は「請求項15」の試験細胞中の神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体活性に対する化合物の作用を、対照細胞に対する作用またはその化合物の不存在下における細胞の神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体活性と比較して測定することからなり、この場合、対照細胞は実質的に試験細胞と同一であるが対照細胞はニコチン性アセチルコリン受容体を発現しない方法。

28. ヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体の活性を修飾する化合物を同定する化合物のスクリーニング方法において、その方法は「請求項21」の試験細胞中の神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体活性に対する化合物の作用を、対照細胞に対する作用またはその化合物の不存在下における細胞の神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体活性と比較して測定することからなり、この場合、対照細胞は実質的に試験細胞と同一であるが対照細胞はニコチン性アセチルコリン受容体を発現しない方法。

29.  $\alpha_4$ または $\alpha_7$ サブユニットから選択される組換えヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体サブユニット。

30. 「請求項29」の1種または2種以上のサブユニットからなる組換えヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体。

31. さらに、少なくとも1種のヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体 $\beta$ サブユニットからなる「請求項30」のヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体。

32. 組換えヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体 $\beta$ サブユニット

33. 「請求項32」のサブユニットからなる組換えヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体。

34. さらに、少なくとも1種のヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体 $\alpha$ サブユニットからなる「請求項33」のヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体。

35. 機能性の神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体サブユニットおよびその組合せを同定する方法において (a) 「請求項1」の少なくとも1種のDNA, またはそれと相補性のRNA, および所望によりヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体の少なくとも1種の $\beta$ サブユニットをコードするDNA, またはそれと相補性のRNAを真核細胞中に導入し, (b) 工程(a)の細胞中の神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体活性を評価することからなり, この場合, 活性は上記導入DNAによってコードされる1種または2種以上のサブユニットを含有する受容体によって仲介される方法。

36. 機能性の神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体サブユニットおよびその組合せを同定する方法において (a) 「請求項10」の少なくとも1種のDNA, またはそれと相補性のRNA, およびヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体の少なくとも1種の $\alpha$ サブユニットをコードするDNA, またはそれと相補性のRNAを真核細胞中に導入し, (b) 工程(a)の細胞中の神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体活性を評価することからなり, この場合, 活性は上記導入DNAによってコードされる1種または2種以上のサブユニットを含有する受容体によって仲介される方法。

37. 「請求項1」のDNAによってコードされる単離mRNA。

38. 「請求項10」のDNAによってコードされる単離mRNA。

39. 「請求項 37」のmRNAでトランスフォームされた細胞.
40. 「請求項 38」のmRNAでトランスフォームされた細胞.
41. さらにヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体の $\beta$ サブユニットをコードするmRNAでトランスフォームされた「請求項 39」の細胞.
42. さらにヒト神経細胞性ニコチン性アセチルコリン受容体の $\alpha$ サブユニットをコードするmRNAでトランスフォームされた「請求項 40」の細胞.
43. 「請求項 29」のタンパク質またはその免疫原部分に対して生成された抗体.
44. 「請求項 32」のタンパク質またはその免疫原部分に対して生成された抗体.

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Appl. No. <b>PCT/US 94/02447</b>		
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> <b>IPC 5 C12N15/12 C07K13/00 C12N5/10 G01N33/68 C12Q1/68</b> <b>C12P21/08</b>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) <b>IPC 5 C12N C07K C12P</b>		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	<b>SOCIETY FOR NEUROSCIENCE ABSTRACTS</b> <b>vol. 19, no. 1-3, November 1993</b> <b>page 69</b> <b>ELLIOTT K; URRUTIA A; JOHNSON E; WILLIAMS M</b> <b>E; ELLIS S B; VELICELEBI G; HARPOLD M M;</b> <b>'Cloning and functional expression of</b> <b>human neuronal nicotinic acetylcholine</b> <b>receptor subunit alpha-2, alpha-3,</b> <b>alpha-4, alpha-7, beta-2 and beta-4'</b> <b>&amp; 23rd Annual Meeting of the Society for</b> <b>Neuroscience, Washington, D.C., USA,</b> <b>November 7-12, 1993.</b> <b>See the Abstract</b> ---	1-44
X	<b>WO, A, 90 10648 (THE SALK INSTITUTE FOR</b> <b>BIOLOGICAL STUDIES, US) 20 September 1990</b> <b>see the whole document</b> --- -/--	1-3, 10, 12, 14-44
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search <b>29 August 1994</b>		Date of mailing of the international search report <b>05. 09. 94</b>
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5518 Patentlaan 1 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3026		Authorized officer <b>Nauche, S</b>

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intr. Int'l Application No.  
PCT/US 94/02447

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>THE JOURNAL OF NEUROSCIENCE vol. 13, no. 2, February 1993 pages 595 - 604 SEGUELA, P. ET AL. 'Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7 : a nicotinic cation channel highly permeable to calcium' see the whole document ---</p>	<p>1,5,6,8, 9,14, 20-24, 29,35, 37,39, 40,42,43</p>
X	<p>FEBS LETTERS. vol. 312, no. 1, November 1992, AMSTERDAM NL pages 66 - 70 TARRONI, P. ET AL.; 'Neuronal-type nicotinic receptors in human neuroblastoma and small-cell lung carcinoma cell lines' see the whole document ---</p>	<p>10-14, 20-23, 25,26, 32-34, 38, 40-42,44</p>
A	<p>WO.A.91 15602 (THE SALK INSTITUTE BIOTECHNOLOGY/INDUSTRIAL ASSOCIATES, INC.; US) 17 October 1991 see the whole document -----</p>	<p>1-44</p>

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 94/02447

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9010648	20-09-90	EP-A- 0463064 JP-T- 4504123	02-01-92 23-07-92
WO-A-9115602	17-10-91	EP-A- 0523187	20-01-93

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>6</sup> 識別記号 片内整理番号 F I

C 1 2 P 21/08 9358-4B

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, ES, FI, G B, GE, HU, JP, KG, KP, KR, KZ, LK, LU, LV, MD, MG, MN, MW, NL, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SI, S K, TJ, UA, US, UZ, VN

(72)発明者 エリス, スチーブン, ビー.

アメリカ合衆国92129 カリフォルニア州  
サン ディエゴ, オビエド ストリート  
8939

(72)発明者 ハーボルド, マイクル, エム.

アメリカ合衆国92021 カリフォルニア州  
エル カジョン, クリーク ヒルズ ロー  
ド 15630